

AUS DER I. INNEREN ABTEILUNG DES
STAEDT. KRANKENHAUSES BERLIN-NEUKOELLN
(AERZTLICHER DIREKTOR: PROFESSOR DR. K. HOLLDACK)
UND
AUS DEM INSTITUT FUEER HAEMOTOLOGIE DER GSF,
ASSOZIATION MIT EURATOM MUENCHEN
(LEITER: PROFESSOR DR. W. STICH)

UNTERSUCHUNGEN ZUR PROLIFERATIONS -
KINETIK VON GEFRIERKONSERVIERTEN
KNOCHENMARKZELLEN IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWUERDE
AN DEN MEDIZINISCHEN FACHBEREICHEN
DER FREIEN UNIVERSITAET BERLIN

VORGELEGT VON
HARTMUT COLLMANN
—
AUS WILHELMSHAVEN

1971

Aus der I.Inneren Abteilung des Städt.Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof.Dr.K.Holldack)

und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit EURATOM
München
(Leiter: Prof.Dr.W.Stich)

UNTERSUCHUNGEN ZUR PROLIFERATIONS -
KINETIK VON GEFRIERKONSERVIERTEN
KNOCHENMARKZELLEN IN VITRO

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hartmut Collmann
aus Wilhelmshaven

Referent: Prof.Dr.med.I. B o l l

Korreferent: Prof.Dr.med.H. B r ü c h e r



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 6.11.1971

Inhaltsverzeichnis

=====

	Seite
Einleitung und Problemstellung	1
Material und Methode	14
Ergebnisse	23
Diskussion	39
Zusammenfassung	55
Statistische Berechnungen	57
Abbildungen und Tabellen	62 - 82
Literaturnachweis	83



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die neuere Entwicklung auf verschiedenen Gebieten der Medizin und Biologie hat seit etwa 20 Jahren zu wachsendem Interesse an der Konservierung lebender Zellen und Gewebe geführt und ein intensives Studium der hiermit verbundenen Probleme veranlaßt.

Im Mittelpunkt standen zunächst die Bemühungen um eine Langzeitkonservierung von Transfusionsblut, um die Nachteile der konventionellen Blutkonservierung zu überwinden. In zahlreichen Untersuchungen an Erythrozyten wurden bis heute wesentliche allgemeine Bedingungen für die Zellkonservierung ermittelt (78). Spätere Versuche zur Herstellung von Leukozyten- und Thrombozytenkonserven (24,29,47,115) gingen von diesen Ergebnissen aus.

Die verbesserten Möglichkeiten der Gewebe- und Organtransplantationen haben weitere Experimente angeregt: Da mit dem Fortschritt der chirurgischen Technik und der immunologischen Gewebetypisierung auch differenzierte Organe mit geringer Ischämietoleranz erfolgreich transplantiert werden können, ist eine Konservierung des Spendermaterials für den oft notwendigen Transport und besonders für die langfristige Aufbewahrung in Organbänken erforderlich (80,132).

Zahlreiche Versuche wurden auch mit Kulturzellstämmen durchgeführt, um Zellbänke für die Gewebezüchtung einzurichten (48,50,146). Die Veterinärmedizin schließlich wendet die Konservierung von Samen zur künstlichen Insemination bereits erfolgreich an.

Die Konservierung von hämopoetischen Zellen entwickelte sich aus den Experimenten mit Blutzellen und wurde in größerem Rahmen seit der klinischen Einführung von Knochenmark-Transplantationen durchgeführt. LORENZ und Mitarbeiter (73) hatten schon 1951 in Tierversuchen

bewiesen, daß transfundierte frische Knochenmarkzellen das tödliche Strahlensyndrom nach einer Ganzkörperbestrahlung verhindern können. Erst nachdem MATHE und Mitarbeiter (86) die Opfer eines Reaktorzwischenfalles erfolgreich mit homologem Knochenmark behandelt hatten, wurde in zahlreichen weiteren Fällen versucht, verschiedene aplastische Erkrankungen des Markorgans durch Übertragung von hämopoetischen Zellen zu beeinflussen (21, 25, 108, 144). Dabei scheiterten homologe Transplantationen zwar sehr oft an der immunbiologischen Abwehrreaktion des Empfängers, aber die Möglichkeit der Immuntoleranz gegenüber homologen und heterologen KM-Transplantaten wurde im Tierexperiment mit verschiedenen Methoden bewiesen (60, 81, 98) und konnte auch beim Menschen gezeigt werden (26, 43, 87, 108 S. 77).

Einige Autoren (26, 52, 64) verwendeten KM-Transfusionen bei der Behandlung von disseminierten Malignomen, um Markaplasien nach therapeutischer Ganzkörperbestrahlung oder Applikation von Zytostatika in letaler Dosis zu beherrschen. Sie entnahmen den Patienten eigenes KM, das sie als autologes Transplantat nach der zytostatischen Behandlung reinfundierten. Das immunologische Hindernis wurde dabei umgangen, jedoch setzte vor allem eine intensivere zytostatische Medikation die Aufbewahrung der entnommenen Zellen über einen längeren Zeitraum voraus.

Von besonderer Bedeutung war deshalb der Nachweis, daß die Schutzwirkung der verpflanzten hämopoetischen Zellen auch nach einer längeren Konservierung unter entsprechender Technik erhalten bleibt (5), womit auch die Einrichtung von KM-Bänken für homologes Spendermaterial grundsätzlich möglich wurde.

Die Konservierung von hämopoetischem Gewebe wirft nun erhebliche technische Schwierigkeiten auf, da die Zellen

wegen ihrer hohen Stoffwechselaktivität nach einer totalen Kreislaufunterbrechung schon wenige Stunden später irreversible hypoxische Schäden erleiden. Eine Möglichkeit zur Verlängerung der Ischämietoleranz ergibt sich jedoch aus der Wärmeabhängigkeit chemischer Reaktionen entsprechend der "RGT-Regel": Durch Anwendung der Hypothermie kann die Stoffwechselaktivität der Zelle und damit ihr Sauerstoff- und Energiebedarf reversibel gesenkt werden.

So konnten BILLEN (12), CORNECI (30) und PERRY (109) Knochenmarksuspensionen schon bei relativ wenig herabgesetzten Temperaturen von $+25^{\circ}$ bis $+4^{\circ}$ in einem Nährmedium bis zu zwei Wochen lang aufbewahren, ohne daß die Zellen ihre spezifischen Eigenschaften verloren. KOWALENKO (62) wies andererseits nach, daß der Idealfall, nämlich der reversible Stillstand aller Lebensfunktionen, die Abkühlung der Zellen weit unter den Gefrierpunkt voraussetzt, da nach seinen Beobachtungen noch bei -45° chemische Reaktionen zur Autolyse von Kern und Plasma führen können.

Lange Zeit schienen jedoch derartige Temperaturen, die für eine langfristige Konservierung erforderlich sind, wegen der zwangsläufig einsetzenden Eisbildung mit dem Leben nicht mehr vereinbar zu sein. Tatsächlich kann man an eingefrorenen Zellen nach dem Auftauen verschiedene Grade der Schädigung bis zur Zellruptur beobachten (90,114).

Viele Versuche wurden unternommen, die Ursachen des Gefriertodes aufzuklären, um ihn auf diese Weise beherrschen zu können. Die frühere Vorstellung (77), daß die Zellen durch wachsende Eiskristalle rein mechanisch lädiert werden, ist inzwischen durch die Untersuchungen, vor allem von MERYMAN (91,92,93), LOVELOCK (75), MAZUR (88) und KAROW (59) korrigiert worden. Wesentliche Ergebnisse ihrer Arbeiten werden von SCHMIDT-MENDE (132) zusammenfassend dargestellt.

Nach den heutigen, noch keineswegs vollständigen Kenntnissen vom Gefriervorgang an der Zelle bilden sich bei langsamer Kühlung streng extrazellulär wachsende Eiskristalle, die der Zelle auf osmotischem Wege Lösungswasser entziehen. Mit zunehmender Größe der Eiskristalle und steigender Elektrolytkonzentration diffundiert auch der Teil des Zellwassers in den extrazellulären Raum, der den kolloidalen Zustand der Zellproteine aufrechterhält. Bei einem bestimmten Grad der Dehydratation werden deshalb die Eiweißkörper denaturiert. Als empfindlichste Strukturen sind vor allem die Lipoproteide der inneren und äußeren Zellmembranen betroffen, deren biologische Funktion damit gestört wird.

Da die Eiweißdenaturierung als chemischer Vorgang wärmeabhängig ist, wurde versucht, den Konservierungserfolg durch rasche Temperatursenkung zu verbessern. Aber mit wachsender Kühlgeschwindigkeit wird die Bildung von kleineren, vorwiegend intrazellulär gelegenen Eiskristallen begünstigt, die zu mechanischen Läsionen der Zellstrukturen führen. Erst bei extrem hoher Kühlrate (ca. $1000^{\circ}/\text{sec}$), die technisch nur in kleinsten Zellsuspensionstropfen erreichbar ist, entstehen nur noch Mikrokristalle ohne schädigenden Einfluß auf die Zelle (115,122,123,129). Für die Konservierung von größeren Volumina ist dagegen nach experimentellen Erfahrungen die langsame Abkühlung geeigneter (68,89, 130).

Während des Auftauens durchläuft das gefrorene Material erneut eine kritische Phase, da bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt die chemischen Reaktionen aktiviert werden. Außerdem kommt es zu Struktur- und Größenänderungen der Eiskristalle (migratory recrystallisation nach MERYMAN,91), die sich bei intrazellulärer Lage deletär auswirken (88,97).

Diese Befunde erklären die Erfahrung, daß die rasche Erwärmung für das Überleben der gefrierkonservierten Zellen entscheidend ist (68,89,116). Zur Aufbewahrung des Gefrierergutes eignen sich vor allem zwei Temperaturbereiche, die einfach und mit hinreichender Genauigkeit realisierbar sind: Die Sublimationstemperatur des Kohlendisäureschnees (-79°C) und die Temperatur des siedenden Stickstoffs (-196°C). PEGG (105) stellte mit verschiedenen Methoden fest, daß Knochenmarkzellen bei -79° im Verlauf von Monaten zunehmend geschädigt werden. Dagegen fand sich bei -196° in vergleichenden Experimenten keine Zellschädigung, die von der Konservierungsdauer abhängig war (27,85,139). MERYMAN (91) erklärte auch diese Befunde mit dem Phänomen der Rekristallisation, da noch bei Temperaturen von -100° bis -130° eine Instabilität der Eiskristalle nachweisbar sei.

Aus der Vorstellung, daß der Gefriertod durch die ansteigende Elektrolytkonzentration infolge Dehydratation verursacht wird, ergibt sich die Forderung nach einem Stoff, der die Konzentrationszunahme so stark vermindert, daß der Kolloidzustand der Zellproteine erhalten bleibt. Diese Substanz wurde auf empirischer Basis gefunden, bevor die theoretischen Grundlagen entwickelt waren: 1946 entdeckten ROSTAND (128), 1949 POLGE, SMITH und PARKES (117) die Schutzwirkung von Glycerin beim Einfrieren von Spermien. SMITH (137) führte die Substanz bei der Gefrierkonservierung von Blut ein, und BARNES und LOUTIT (5) konnten in Versuchen an Mäusen durch 15 %igen Glycerinzusatz die Strahlenschutzwirkung von hämopoetischen Zellen nach dem Einfrieren erhalten. MALININ und Mitarbeiter (85) berichteten schließlich über erfolgreiche Transplantationen konservierter Knochenmarkzellen beim Menschen.

Die Erfolge mit Glycerin regten die Suche nach anderen Substanzen mit ähnlichen Eigenschaften an: PER-SIDSKY und RICHARDS (110,113) führten PVP als Schutzstoff in die Knochenmarkskonservierung ein. Die Wirksamkeit schien mit der des Glycerins durchaus vergleichbar (112), obwohl der Wirkungsmodus bis heute weitgehend unbekannt geblieben ist. 1959 entdeckten LOVELOCK und BISHOP (76) den schützenden Effekt von Dimethylsulfoxid (DMSO), einer Flüssigkeit, die bis dahin als industrielles Lösungsmittel verbreitet war, aber wegen ihrer außerordentlichen Diffusionsfähigkeit auch in der perkutanen Pharmakotherapie angewandt wurde (14,56,58,127).

ASHWOOD-SMITH (1), der Knochenmarkzellen in einer 10 %igen DMSO-Lösung konservierte, erzielte mit der neuen Substanz bessere Ergebnisse als mit Glycerin. Sein Urteil wurde später von anderen Autoren bestätigt (33,46,118). Als optimal wurde eine DMSO-Konzentration von 10 % (28,111) bis 15 % (107), experimentell ermittelt.

Obwohl Glycerin und DMSO ganz unterschiedliche chemische Verbindungen sind, haben sie entscheidende Eigenschaften gemeinsam: Beide Stoffe sind niedermolekulare, leicht diffusible Nichtelektrolyte mit einem außerordentlich hohen Wasserbindungsvermögen, das für ihren gemeinsamen Wirkungsmechanismus verantwortlich gemacht wird. Entsprechend LOVELOCKs (75) Theorie, die durch Befunde von FARRANT (37) und GREAVES (46) gestützt wird, binden sie einen Teil des Zellwassers so fest, daß die Dehydratation der Zelle während der Eisbildung auf ein erträgliches Maß reduziert und damit die Eiweißdenaturierung verhindert wird. Mit diesem Effekt scheint eine Veränderung des Kristallisationsmodus eng verbunden zu sein (32,46,126).

Die Überlegenheit des DMSO gegenüber dem Glycerin wird von BICKIS (10) und HENDERSON (51) mit seiner besseren Penetrationsfähigkeit begründet; denn DMSO verteilt sich ca 20-fach schneller im extra- und intrazellulären Raum als Glycerin und kann deshalb die Zellen trotz seiner eigenen osmotischen Wirksamkeit kaum schädigen.

Nach Transfusion von Glycerin-Zellsuspensionen wird der Schutzstoff als körpereigene Substanz in den physiologischen Stoffwechsel eingebaut. DMSO dagegen wird innerhalb von kurzer Zeit über die Nieren und Lungen ausgeschieden, was sich im typischen Geruch der Atemluft äußert (14,61).

Mit dem technischen Problem der Gefrierkonservierung ist die Frage nach dem Maßstab für den Konservierungserfolg unmittelbar verknüpft. So wird man vor jeder Transfusion von tiefgekühlten Knochenmarkzellen ihre Lebensfähigkeit überprüfen müssen. Darüber hinaus hat sich gezeigt, daß die Weiterentwicklung der Konservierungsmethoden wegen der Unzuverlässigkeit oder Umständlichkeit der meisten verfügbaren Vitalitätsteste erschwert wird. Deshalb haben sich viele Untersucher, die sich mit der Zellkonservierung befassen, um eine befriedigende Lösung der Frage bemüht. Eine Reihe unterschiedlicher Testverfahren zur Kontrolle des Konservierungserfolges ist bisher entwickelt worden (82). Zu den wichtigsten gehören:

1. Die vergleichende Zellzählung und Beurteilung von gefärbten Ausstrichen.
2. Die Farbexclusionsteste und die Supravitalfärbung (49,133).
3. Die Bestimmung der DNS- und Proteinsynthese mit markierten Bausteinen (38,113,142).

4. Die Lebendbeobachtung mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie (84,105,114,144).
5. Die Gewebekultur (27,69,118).
6. Das biologische Experiment.

Als zuverlässigster Vitalitätstest gilt bis heute der Tierversuch mit Transplantation des konservierten Knochenmarks auf ganzkörperbestrahlte Individuen und Beobachtung der Heilung der radiogenen Knochenmarkschädigung, womit die klinische Situation nachgeahmt wird. Der Test basiert auf dem Nachweis, daß der sogenannte Strahlenschutzfaktor (radiation recovery factor) zellulärer Natur ist (4,5,71), dh. an die Proliferationsfähigkeit des übertragenen Knochenmarks, genauer der hämopoetischen Stammzellen, gebunden ist. Der Transplantationserfolg wird entweder anhand der Überlebensrate mit letaler Dosis bestrahlter Empfänger-tiere bestimmt (28,73,134,140), oder man beobachtet die Normalisierung des peripheren Blutbildes (145) die Auffüllung der leeren Markräume des Empfängers (1) oder die Bildung von Knochenmarkzellmetastasen in der Empfänger-milz (68,143). Der Wert des Verfahrens wird jedoch dadurch eingeschränkt, daß die im Tierversuch gewonnenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse beim Menschen übertragbar sind. Ferner ist neben der zeitraubenden und aufwendigen Technik auch das Problem der biologischen Streuung zu berücksichtigen.

Demgegenüber liefern in vitro-Untersuchungen wegen leicht kontrollierbarer Bedingungen besser reproduzierbare Ergebnisse. Mit diesen Methoden sind verschiedene Vitalfunktionen der Zelle nachweisbar, etwa die Motilität der reifen Zellen, Phagozytose und Pinozytose oder die DNS-Synthese in teilungsfähigen Vorstufen, die selektive Permeabilität der Zellmembran

für Farbstoffe und die Anfärbbarkeit mit Vitalfarbstoffen. Allerdings hat PEGG (107) darauf hingewiesen, daß damit noch keine sicheren Aussagen über die ungestörte Vitalität des Knochenmarks insgesamt möglich sind, da nur Partialfunktionen des Zellstoffwechsels oder aber Spezialfunktionen bestimmter Zellgruppen geprüft werden, dazu mit Methoden, die teilweise sehr störanfällig sind.

Der Zelltod wird andererseits, wie MALININ (82) betont, von morphologischen und biochemischen Verfahren nicht direkt, sondern erst im Stadium der fortgeschrittenen Autolyse erfaßt.

Trotz dieser Einschränkungen werden die genannten in vitro-Methoden, mit Ausnahme des Farbboxclusionstestes, der sich als unbrauchbar erwiesen hat (7,30,69), von vielen Autoren zur Prüfung der Vitalität konservierter Knochenmarkzellen benutzt (22,29,108 S.149 ff, 144 S. 11 ff).

Dies gilt besonders für die autoradiographische Bestimmung der DNS-Synthese nach kurzfristiger Inkubation in einem Kulturmilieu (6,38,142); denn aus dem Einbau von markierten Nucleotiden in die Zellkerne läßt sich die Regeneration der teilungsfähigen Vorstufen berechnen (53). Damit wird das Verfahren zum quantitativ verwertbaren Maßstab für die Proliferation des Knochenmarks, obwohl über Störungen der Zellreifung ebenso wenig Aussagen möglich sind wie über die Vitalität von teilungsunfähigen reifen Zellen oder von teilungsfähigen, aber ruhenden Zellen, deren Existenz in vivo sehr wahrscheinlich ist (16,19). Entscheidende Nachteile der DNS-Markierung liegen aber in der sehr zeitraubenden und gegenüber äußeren Einflüssen empfindlichen Technik, die zu stark schwankenden Ergebnissen führt (108,S.152 ff).

Dagegen hat sich gezeigt (16,S.24 ff, 67), daß die Zählung und Differenzierung der Mitosen im gefärbten Ausstrichpräparat zu denselben Ergebnissen über die Proliferationsrate führt wie der DNS-Synthesetest. Da diese Methode wesentlich einfacher, rascher durchführbar und weniger störanfällig ist, erscheint sie zur Kontrolle der Knochenmarkkonservierung besser geeignet.

Um eine Störung der Regeneration nach dem Auftauen erfassen zu können, setzt die Berechnung der Mitosen ebenso wie der DNS-Synthesetest eine Kultivierung der konservierten Zellen voraus.

Mit diesem Vorgehen sind jedoch weitere Vorteile verbunden, weil in der Gewebekultur gleichzeitig alle anderen Vitalfunktionen studiert werden können. Nach DAVIES (31) ist die Kultur als Vitalitätstest den übrigen in vitro-Methoden überlegen; denn sie ist

1. ein direkter und gleichzeitig globaler Vitalitätstest,
2. eine unkomplizierte Methode, da zur Untersuchung der Zellen hämatologische Standardmethoden ausreichen,
3. eine genaue Methode, weil die Milieubedingungen der Kultur leicht kontrollierbar sind und jede einzelne Zellklasse beobachtet werden kann.

Trotzdem liegen in der bisherigen Literatur über Kulturversuche mit gefrierkonserviertem Knochenmark nur wenige Berichte vor, aus denen keine quantitativen Befunde über die Morphologie und Proliferation der aufgetauten Zellen in vitro hervorgehen. MALININ und PEGG (85) beschreiben lediglich ein peripheres Auswachsen von Zellen aus tiefgefrorenen Knochenmarkbröckchen in der Koagulumkultur. HATHAWAY (49) benutzte als Maßstab für die Überlebensrate der Knochenmarkzellen ihre

Fähigkeit zu fibroblastischer Umwandlung nach mehr-tägiger Bebrütung in der Suspensionskultur. RICHARDS und PERSIDSKY (125) sowie BOURONCLE (22) bestimmten mit Hilfe der Phasenkontrast-Optik den Anteil von lebenden und abgestorbenen Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Durch Vergleich mit Kulturen von frischen Zellen schätzten sie den Konservierungserfolg ab. Von DAVIES (31) und BRUCH (24) wurden tiefgefrorene Lymphozyten erfolgreich kultiviert. Unter Stimulation mit Phytohaemagglutinin (PHA) kam es zur Transformation der Zellen und zu lebhafter mitotischer Aktivität. Der Versuch einer Zellzählung ergab jedoch keine verwertbaren Resultate. LEWIS und Mitarbeiter (69) konnten eine Proliferation von konservierten Knochenmarkzellen lediglich bei Kultivierung in vivo, nicht aber in vitro nachweisen. Die Ursache dafür, daß genaue Studien an konserviertem Knochenmark in der Gewebekultur bisher fehlen, kann in technischen Schwierigkeiten bei der Knochenmarkkultivierung vermutet werden. Denn an Fibroblasten und Tumorzellstämmen aus Standardkulturen wurde bereits in vielen Arbeiten eine ungestörte Proliferation nach der Gefrierkonservierung demonstriert (27,33,48,89).

Eine Knochenmarkzüchtung mit stetiger Regeneration und Reifung ist dagegen nach LAJTHA (66) nicht möglich, da die Regeneration in vitro bald abnimmt. So scheiterten wiederholte Versuche mit Langzeitkulturen (12,13,57,124) regelmäßig an der Neigung der Knochenmarkzellen, sich nach längerer Inkubation in bindegewebsähnliche Elemente umzuwandeln und die hämopoetische Funktion aufzugeben.

Die Kritik an der Knochenmarkkultur wird deshalb mit den unphysiologischen Bedingungen begründet, die sie als Vitalitätstest unbrauchbar machen sollen.

Bei der mathematischen Auswertung von Knochenmark - kulturen (15) zeigte sich jedoch, daß Differenzierung und Regeneration während der ersten drei Tage in vitro mit den physiologischen Verhältnissen vergleichbar sind, so daß an Kurzzeitkulturen zahlreiche quantitative Befunde über die Proliferation von normalem und pathologisch verändertem hämopoetischem Gewebe erhoben werden konnten (16,17,18,19). Deshalb ist die Erwartung begründet, daß mit dieser Methode auch die Kenntnisse über die Wirkung des Gefrierprozesses auf Knochenmarkzellen erweitert werden können.

In der vorliegenden Arbeit soll zu folgenden Fragen Stellung genommen werden:

1. Genügt die hier verwendete Kulturtechnik als Vitalitätstest den gestellten Forderungen
 - a) nach weitgehend physiologischen Bedingungen während der ersten 48 - 72 Stunden,
 - b) nach Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse?
2. Wird die Proliferationsfähigkeit der Knochenmarkzellen bei der angewendeten Konservierungsmethode erhalten?
3. Ergeben sich in vitro Hinweise auf eine Störung der Regeneration und Reifung von tiefgekühlten Knochenmarkzellen, die auf eine latente Schädigung der Zellen schließen lassen?
4. Zeigen alle Zellklassen die gleiche Sensibilität gegenüber dem Gefrierprozeß?
5. Läßt sich aufgrund der erhobenen Befunde in vitro eine Aussage über den Wert der benutzten Konservierungsmethode für klinische Zwecke machen ?

Von den verschiedenen Kultivierungsverfahren schien für unsere Untersuchungen die Suspensionskulturtechnik am besten geeignet: Einerseits bestehen nur in einer Suspension für alle Zellen gleichartige Milieubedingungen, die vor allem für den Kontakt mit dem Gefrierschutzstoff wesentlich sind. Andererseits erlaubt diese Technik eine absolute Zellzählung und damit eine genauere quantitative Analyse des Konservierungserfolges. Darüber hinaus wird die klinische Praxis berücksichtigt, weil das Spender-Knochenmark als Zellsuspension intravenös transfundiert wird.

Die Herstellung einer homogenen Zellsuspension war beim menschlichen Knochenmark ohne wesentliche Schwierigkeiten möglich. Das von WITTE (145) empfohlene Verfahren stellte sich als schonend und für geringe Materialmengen am besten geeignet heraus.

Die Technik der Suspensionskultur wurde von OSGOOD und Mitarbeitern (99,100,101) eingeführt und von LAJTHA (65) weiterentwickelt. Vereinfachte Modifikationen der ursprünglichen Technik wurden in neuerer Zeit von BERMAN (9), ERSLEV und HUGHES (35), FARNES und BARKER (36) und von KRANTZ (63) angegeben. Besonders OSGOOD und KRIPPAEHNE (102) wiesen auf verschiedene Faktoren hin, deren optimale Einstellung im Kulturmilieu entscheidend ist. Dazu gehören die Zelldichte, die Schichttiefe des Mediums, die Wasserstoffionenkonzentration und das Volumenverhältnis der Flüssigkeitsphase zur Gasphase. Die Erfahrungen dieser Autoren wurden bei der Entwicklung der hier angewendeten Methode berücksichtigt. In eigenen Vorversuchen, die wir zunächst mit Rattenknochenmark, dann mit menschlichen Zellen durchführten, erwies sich eine Technik, die weitgehend der von SMITH (138) vorgeschlagenen Modifikation entspricht, am einfachsten und erfolgreichsten.

M a t e r i a l

=====

1. Zellen (Tabelle A)

Von sieben Patienten wurde Knochenmark nach der Standardtechnik durch Sternalpunktion (6 Fälle) oder durch Beckenkammpunktion (1 Fall) gewonnen. Maligne Erkrankungen des hämopoetischen oder des lymphatischen Apparates wurden ausgeschlossen, ebenso Patienten, die zytostatische Medikamente erhalten hatten. Da für die Versuche zellreiche Punktate mit einem Ertrag von 10^7 - 10^8 Zellen benötigt wurden, waren Fälle von angeregter Hämatopoese bevorzugt.

2. Nährlösung

Das Kulturmedium bestand zu 75 % aus Parker's Medium TC 199 mit Phenolrotzusatz als Indikator. Der Gehalt an autologem Serum betrug 25 %. Dem fertigen Kulturmedium wurden 10 γ /ml Streptomycin und 50 γ /ml Ampicillin zugesetzt.

3. Gefrierschutzstoff

DMSO war im Gefriergemisch in einer Konzentration von 10 % enthalten. Es wurde uns als DMSO puriss. von Fa. Schering AG, Berlin dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

4. Instrumente zur Präparation des Knochenmarks

Rekordspritzen à 2 ml und 5 ml mit genau eingepaßtem Spritzenstempel. Ophtalmologische Starmesser oder kleine Skalpelle. Kanülen verschiedener Stärke aus einwandfreiem V2A-Stahl, bzw. Chrom-Nickel. Blockschälchen und Petrischalen. Dünngezogene Pasteur-Pipetten, Leukozyten-Zählpipetten.

5. Kulturflaschen

25 ml-Erlenmeyerkolben aus Jenaer Glas (Labor-Therm^R), die mit festsitzenden Gummistopfen (para-R-grau, ohne Schwefel von Fa. Deutsch u. Neumann, Berlin) verschlossen wurden.

6. Gefrierbehälter

Sie wurden aus Glasrohr selbst hergestellt. Die Glasrohrabschnitte hatten einen Durchmesser von 6 mm, eine Wandstärke von 0,3 mm, ein Oberflächen-Volumen-Verhältnis von ca $7 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ und eine Länge von 15 cm. Ein Ende wurde zugeschmolzen, das andere nach etwa 10 cm über der Flamme zu einem schmalen Ampullenhals ausgezogen, der nach der Beschickung rasch zugeschmolzen werden konnte. Die Abmessungen begünstigten einen raschen Wärmeausgleich zwischen Ampulleninhalt und Außenmilieu; sie entsprachen damit den von PEGG und PLAYFAIR (116) empfohlenen Daten.

Alle Glasgeräte und Instrumente wurden vor Gebrauch unter fließendem heißem Wasser ohne Zusatz von Chemikalien gründlich bis zur vollständigen Benetzbarkeit gereinigt, sehr sorgfältig unter fließendem Leitungswasser und in aqua dest. gespült, anschließend in Heißluft bei 180°C sterilisiert. Die Gläser wurden nicht silikonisiert. Gummistopfen wurden im Autoklaven sterilisiert.

Im übrigen wurden bei der Bearbeitung und Untersuchung des Zellmaterials die allgemeinen Regeln der bakteriologischen Arbeitstechnik beachtet, um eine bakterielle Verunreinigung des Materials zu vermeiden.

7. Tiefkühltruhe

Es stand ein Ultrakryostat UK 80 der Fa. Lauda-Meßgerätewerk Dr. Wobster zur Verfügung.

Das 20 l Methanol fassende Kühlbad des Gerätes kann

bis auf -88°C gekühlt werden. Der eingebaute Temperaturregler ermöglicht mit vier Wahlschaltern die genaue Einstellung einer gewünschten Temperatur zwischen -80° und $+40^{\circ}\text{C}$. Darüber hinaus kann die Kühlgeschwindigkeit über einen Programmgeber variiert werden, sie beträgt im Temperaturbereich von $+30$ bis -30° maximal $3^{\circ}/\text{min}$, bei tieferen Temperaturen bis $2^{\circ}/\text{min}$. Eine Kühlrate von $1^{\circ}/\text{min}$ wird von der Maschine im ganzen Temperaturbereich exakt eingehalten.

M e t h o d e

Herstellung einer Knochenmarksuspension:

Das aspirierte Knochenmark wurde in Heparin-haltiger Hankslösung (ca 5 - 10 E Liquemin^R)/ml) aufgefangen und in einer Petrischale bis zur Verarbeitung nach spätestens einer Stunde aufbewahrt. Mit einem kleinen Messer wurden die einzelnen Markbröckchen aus der bluthaltigen Hankslösung in ein Blockschälchen gebracht, das je nach Ergiebigkeit des Punktats 2-4-8 ml TC 199 enthielt.

Um eine gleichförmige Zellsuspension herzustellen, wurde das Knochenmark aus dem Blockschälchen 3 - 6 mal durch dünne Kanülen (Nr.14 oder 12) in eine Rekordspritze vorsichtig aspiriert und wieder ausgespritzt. Bestand das Punktat aus großen und zähen Bröckchen, wurde es zunächst mit weitlumigen Kanülen zerkleinert (Nr.1,2 oder S1), wonach die Passage auch durch Kanülen Nr.12 und 14 gelang. Die Zahl der Passagen durch die Kanülen blieb möglichst niedrig, um die Zellen nicht unnötigen mechanischen Belastungen auszusetzen. Die überstehende Fettschicht wurde bei der letzten Passage in der Spritze zurückgelassen.

Von der frisch hergestellten Stammsuspension wurden verschiedene Proben entnommen:

- a) 2 Leukozyten-Zählpipetten wurden für die absolute Zellzählung gefüllt.
- b) Aus ca 0,5 bis 1 ml wurden Ausstriche angefertigt.
- c) Von 1 ml wurde eine Suspensionskultur angesetzt, die als Kontrolle diente. Die übrige Zellsuspension wurde eingefroren.

In einem Fall (Versuch Nr.IV) wurde die Stammsuspension aus dem sehr ergiebigen Punktat in zwei gleiche Portionen geteilt, die getrennt weiterbearbeitet wurden (Versuch IV A und B).

Zellzählung:

Die absoluten Zellzahlen wurden nach der Standard - methode in der Zählkammer bestimmt. Als Verdünnungs- lösung diente Türk's Reagenz: 1 %ige Essigsäure mit Zusatz von 0,01 % Gentianaviolett. Es wurden immer dieselben zwei Schilling-Haemozytometer benutzt, die jeweils zwei 1/10 mm tiefe Kammern mit neun Feldern à 1 mm² enthielten. Bei allen Zählungen wurden die Kammern nacheinander aus zwei Pipetten beschickt, so daß insgesamt acht Kammern mit je neun Feldern durchgezählt wurden. Das Resultat, multipliziert mit dem Faktor 100/72, ergab den Zellgehalt der Suspension pro mm³.

Ausstriche:

Eine kleine Probe der Suspension wurde in einem spitzen Zentrifugenröhrchen 5 min bei 500 U/min (= 60 g) zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde möglichst vollständig dekantiert, das Sedi- ment in dem kleinen Rest des Überstandes resuspen- diert und mit einem geschliffenen Deckgläschen wie ein Blutausstrich auf Objektträger ausgebreitet. Die über Nacht luftgetrockneten Präparate wurden nach Pappenheim sukzessiv mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösung gefärbt.

Zur Auswertung wurden von jedem Präparat 1000 Zellen unter der Ölimmersion differenziert. Die verschiede- nen Reifeklassen wurden ebenso wie Mitosephasen nach den von BOLL (16,17) beschriebenen Kriterien identi- fiziert. Insgesamt liegen den dargestellten Versuchs- ergebnissen Differentialzählungen von 52 000 Zellen zugrunde.

Kulturen von frischen Zellen:

In jedem Versuch wurde mindestens eine Kontrollkultur angesetzt. Sie enthielt in einem 25 ml-Erlenmeyer - kolben:

- 1 ml der frischen Zellsuspension
- 5 ml Nährlösung (TC 199, bzw. MEM Eagle)
- 2 ml frisches autologes Serum
- 10 γ / ml Streptomycin
- 10 γ / ml Ampicillin.

Die anfängliche Zellkonzentration lag zwischen 1000/mm³ und 4000/mm³.

Die aktuelle Wasserstoffionen-Konzentration wurde über den im Medium enthaltenen Indikator Phenolrot kontrolliert und zusätzlich mit Indikatorpapier (Merck pH 6,4 - 8,0) geschätzt. Grenzwerte von pH 6,4 und pH 8 durften nicht überschritten werden. In einzelnen Fällen schien es notwendig, den pH-Wert nachzuregulieren. Dazu wurde entweder ein Gasgemisch aus 5 % CO₂ und 95 % O₂ über eine Kanüle in das Medium eingeleitet oder umgekehrt die Kulturflasche geöffnet, damit überschüssiges CO₂ abrauchen konnte. Im übrigen wurde auf eine künstliche Gasphase verzichtet.

Die Kulturen wurden 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Sie blieben, bis auf die Entnahme von kleinen Proben zur Untersuchung, unberührt. Nach einer Inkubationsdauer von zwei Stunden sowie nach 24,48 und 72 Stunden wurden die sedimentierten Zellen vorsichtig aufgeschüttelt, zwei Proben mit Leukozyten-Zählpipetten entnommen und die Zelldichte, wie oben beschrieben, bestimmt.

Gleichzeitig wurde eine dritte Probe im nativen Zustand in einer Zählkammer untersucht. Das Präparat wurde unter einem binokularen Mikroskop mit dem 40er Trockenobjekt bei halbgeschlossener Blende durch -

mustert und der Anteil an Zellklumpen, Zelltrümmern und Bewegungsformen geschätzt.

Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden in der oben beschriebenen Weise Ausstriche angefertigt, ausgewertet und mit den Ausstrichen der frischen Zellsuspension verglichen.

G e f r i e r k o n s e r v i e r u n g

=====

Vorbereitung:

Dem größten Teil der frischen Knochenmarkzellsuspension (2 - 6 ml) wurde unter leichtem Schütteln DMSO tropfenweise bis zu einer Konzentration von 10 % zugesetzt. Das Gemisch wurde in kleinen Portionen in den selbst hergestellten Gefrierampullen eingefroren. DMSO wurde entweder rein oder als 33%ige Lösung in TC 199 verwendet, letzteres in der Absicht, den osmotischen Schock durch die extrem hygroskopische Substanz zu verringern.

Einfrieren:

Bis zum Kühlbeginn hatte der Schutzstoff bereits 10 - 20 min lang auf die Zellen eingewirkt. Diese Zeit war zum Füllen und Verschließen der Gefrierbehälter notwendig und schien nach PERSIDSKY (111) ausreichend für eine gleichmäßige Verteilung des DMSO auch innerhalb der Zellen. Die zugeschmolzenen und gekennzeichneten Ampullen wurden in das Kühlbad bei $+2^{\circ}$ gehängt und mit einer Rate von 1 $^{\circ}$ /min bis wenig unter den Gefrierpunkt, der für die Suspension bei -17 bis -20° lag, gekühlt. Danach wurde mit maximaler Maschinenleistung, entspre-

chend ca 2 - 3°/min, gekühlt bis zum erreichbaren Temperaturminimum von -88°.

Auftauen und Verarbeitung:

Nach 24-stündiger Lagerung bei -88° wurde das Material durch Eintauchen der Ampullen in ein Wasserbad von 37 - 38°C sehr rasch aufgetaut. Zur Unterstützung des Wärmeaustausches wurden die Ampullen im Wasser ständig bewegt, so daß nach ca 10 Sekunden der Schmelzpunkt erreicht und nach insgesamt 25 - 30 Sekunden das Eis in den Ampullen vollständig geschmolzen war.

In drei Fällen (Vers.Nr.III,VI,VII) wurden Knochenmarkproben drei bzw. sieben Tage lang im Kühlbad aufbewahrt.

Unmittelbar nach dem Auftauen wurden die noch kalten Ampullen aus dem Wärmebad genommen und der Inhalt bei Zimmertemperatur sofort verarbeitet, wobei mit Rücksicht auf die besondere mechanische Fragilität der Zellen (104) unnötige Manipulationen vermieden wurden.

Nach Entnahme von Proben für die absolute Zellzählung wurde die aufgetaute Suspension in einer Spritze langsam mit dem doppelten Volumen TC 199 vermischt und damit die Konzentration des DMSO auf etwa 3,3 % gesenkt.

Ausstriche, wie oben beschrieben, wurden entweder von der frisch aufgetauten, unverdünnten oder von der verdünnten Zellsuspension hergestellt und differenziert.

Kultur von konservierten Zellen:

Der Rest der verdünnten Suspension (3 - 6 ml) wurde zentrifugiert, der Überstand mit der Pipette vollständig

abgehoben und das Sediment in ein vorbereitetes Nährmedium gegeben. In dieser analog den Kontrollkulturen hergestellten Kultur waren enthalten:

0,1 - 0,2 ml Zellsediment der aufgetauten Suspension

5,8 - 5,9 ml TC 199

2 ml autologes Serum (frisches oder eingefrorenes vom Vortage)

10 γ /ml Streptomycin, 50 γ /ml Ampicillin .

Diese Kulturen enthielten noch einen Rest des DMSO, jedoch lag die Konzentration unter 0,1 %, da das Zellsediment, dessen DMSO-Gehalt bereits auf ein Drittel vermindert war, in der Kultur noch einmal mindestens um den Faktor 40 verdünnt wurde. Die Zelldichte in diesen Kulturen war meist geringer als in den nicht gefrorenen Kontrollkulturen. Der pH-Wert mußte in mehreren Fällen durch CO₂-Begasung eingestellt werden, besonders wenn tiefgekühltes Serum vom Vortage verwendet wurde.

Nach 24 und 48 Stunden Inkubation wurden, wie bei den Kontrollkulturen, Proben entnommen, um

1. die Zellkonzentration mit der Zählkammer zu bestimmen,
2. die Zellen im Nativpräparat zu beurteilen,
3. Ausstriche anzufertigen und nach Pappenheim zu färben.

Statistische Berechnungen:

Die Testverfahren zur statistischen Überprüfung der Ergebnisse sind auf den Seiten 57 - 61 zusammenhängend dargestellt.

E r g e b n i s s e

FrISChe Zellsuspension:

Die frISChe Knochenmarksuspension bestand zum größten Teil aus isolierten Zellen, die in gefärbten Ausstrichen und im phasenoptischen Nativpräparat intakt und vital aussahen und oft typische Bewegungsformen zeigten. Man sah nur wenige lädierte Zellen oder Zelltrümmer. Allerdings enthielt die überstehende Fettschicht, die verworfen wurde, reichlich Detritus. Ungefähr 20 % aller Zellen lagen zu je zwei bis sechs in lockeren Verbänden zusammen, größere Klumpen waren selten. Die Ausstriche ließen vermuten, daß bestimmte Zellen bei der Passage durch dünne Kanülen mechanisch zu stark belastet wurden: Vor allem Megakaryozyten wurden im Präparat kaum noch gefunden. Die Retikulumzellen waren, verglichen mit den Ausstrichen von frisch aspirierten Markbröckchen, etwas vermindert. Auch die Mitoseindices, d.h. die Häufigkeit der Mitosen unter 1000 teilungsfähigen Erythroblasten oder Granuloblasten, lagen oft unter den Werten der Bröckchenausstriche.

Kulturen von frischen Zellen

a) Ergebnisse der Zellzählung (Tab.B, Abb.1):

In der Kultur proliferierten die Zellen in den ersten 24 bis 48 Stunden. Die Zelldichte nahm in diesem Zeitraum durchschnittlich um 10 - 20 % zu. Am dritten Tag in vitro sank der absolute Zellgehalt im allgemeinen wieder, behielt aber nach 72 Stunden noch Werte, die meist über der Ausgangszahl lagen. Nur in zwei Fällen (Versuch Nr.II und V) nahm die Zellzahl sofort ziemlich gleich-

mäßig ab. In beiden Fällen mußte angenommen werden, daß die Milieubedingungen nicht optimal waren, obwohl in methylenblau-gefärbten Ausstrichen keine Bakterien nachgewiesen wurden. Diese Kulturen wurden deshalb im Diagramm (Abb.1) nicht aufgeführt.

In einem weiteren Versuch (Nr.III) nahm die Zellzahl nach einem raschen Anstieg am 1.Tag bis zum 3.Tag ebenso rasch wieder ab. Hierbei handelte es sich jedoch um Megaloblastenmark, und es mußte ein besonderes Verhalten der Zellen angenommen werden.

b) Nativpräparate:

Im nativen Zustand glichen die Kulturen nach 24 Stunden Inkubation noch der frischen Suspension: Die Zellen waren fast vollständig isoliert und zum Teil lebhaft beweglich. Detritus kam praktisch nicht vor.

Nach 48 bis 72 Stunden nahm der Anteil an Wanderformen zu; gleichzeitig traten in vielen reifen, mobilen Zellen und in einigen Blasten stark lichtbrechende Granula oder Vakuolen auf.

Häufig konnten in verschieden alten Kulturen Mitose - abläufe verfolgt werden, allerdings wegen der optischen Bedingungen des normalen Lichtmikroskops und der Zählkammer nur die Endphasen, die an der beginnenden Plasmaeinschnürung erkannt wurden. Eine durchgehend beobachtete Telophase dauerte sechs Minuten; bis zur Trennung der Tochterzellen vergingen weitere zehn Minuten.

c) Differentialzählung (Abb.3-6), absolute Zahlen einzelner Zellklassen (Tab.C)

Alle Kontrollkulturen veränderten sich in der Differentialverteilung der Zellen gleichartig. Die wesentlichen Befunde werden hier am Beispiel der Versuche Nr.III, IV und VI dargestellt:

Die Ausstrichpräparate von den Kulturen zeigten nach 24-stündiger Inkubation in der Erythropoese schon eine geringe, aber in den Reifungskurven (Abb.3 - 6) deutlich sichtbare Rechtsverschiebung. Wie am Diagramm ablesbar, hatte der Anteil der reifen Erythroblasten auf Kosten der Vorstufen zugenommen. Der G/E-Index, das quantitative Verhältnis der Granulozytopoese zur Erythropoese, verschob sich erheblich zugunsten zur Erythropoese (Tab.C). Nach 48 bis 72 Stunden fiel die Rechtsverschiebung noch mehr auf. Gleichzeitig sank der relative Anteil der Erythropoese wieder, wie im ansteigenden G/E-Index zum Ausdruck kam.

Mitosen wurden in der Erythropoese bei allen teilungsfähigen Blasten und in allen Phasen beobachtet. Der gesamte rote Mitoseindex blieb am ersten Tag in der Kultur auf dem annähernd gleichen Niveau wie in der frischen Suspension; erst nach 48 bis 72 Stunden ließ die Teilungsaktivität im Durchschnitt etwas nach (rMI in Tab.C, Tab.D). Die Verteilung der Mitosephasen in der gesamten Erythropoese änderte sich in vitro gegenüber der frischen Suspension nicht, wie die karyologischen Kurven (Abb.11 und 12) zeigen. Ein Hinweis auf eine Störung des Mitoseablaufs ergab sich also nicht.

Innerhalb der Granulozytopoese trat nach 24 Stunden zunächst eine Linksverschiebung auf, bedingt durch eine relative Vermehrung der Promyelozyten und Myelozyten. Danach nahm der Anteil der Vorstufen zugunsten der reifen Granulozyten nur langsam wieder ab, so daß eine Rechtsverschiebung erst nach 72 Stunden in den Reifungskurven eindeutig sichtbar wurde. Die Mitoseaktivität der Granuloblasten übertraf in vitro teilweise die Werte der frischen Zellsuspension und blieb während der ganzen Inkubationszeit annähernd konstant (wMI in Tab.C).

Häufig traten am zweiten und dritten Inkubationstag erste Degenerationszeichen auf. Vor allem segment - kernige Granulozyten zeigten oft zahlreiche kleine Vakuolen, die im Nativpräparat als stark lichtbrechende "Glanzkörner" auffielen. Gelegentlich kamen reife Zellen mit fragmentierten Kernen vor.

Aus den Ergebnissen der Kammerzählung und der Differentialverteilung wurde in vier von acht Fällen die absolute Zellzahl in der Kultur für jede einzelne Zellart berechnet (Tab.C). Damit konnte direkt nachgewiesen werden, welche Reifeklassen sich vermehrten oder verminderten. Die ermittelten Werte bestätigen insgesamt das Bild, das sich aus den Reifungskurven ergab. In einigen Punkten waren jedoch genauere und eindeutigere Aussagen möglich:

In der Erythropoese war als auffälligster Befund nach 24 Stunden eine starke Zellvermehrung um 30 bis 70 % festzustellen, vor allem infolge Zunahme der reifen, weniger der polychromatischen, Erythroblasten. Die reifen Erythroblasten vermehrten sich in den ersten 48 Stunden um den Faktor 3 bis 20. Die polychromatischen Erythroblasten nahmen in derselben Zeit nur wenig zu, während die Zahl der basophilen Vorstufen nach 48 Stunden absank. Am zweiten und dritten Kulturtag fiel die Zellzahl der ganzen Erythropoese rasch bis auf 40 bis 70 % des Ausgangswertes ab.

Anders verhielt sich das Megaloblastenmark im Versuch Nr. III. (Anm.: Bei der Differenzierung wurde zwischen Normo- und Megaloblasten nicht unterschieden). Hier kam es am ersten Tag in vitro zu einer starken Vermehrung der basophilen Erythroblasten, die am nächsten Tag wieder zurückging und dafür bei den polychromatischen

Erythroblasten nachzuweisen war. Dagegen vermehrten sich die reifen Erythroblasten etwas weniger als in den übrigen Kulturen (Versuch Nr. IV A,B und VI).

Die Zellzahl der Granulozytopoese stieg in den Kontrollkulturen bis auf den Fall III während der gesamten Inkubationszeit ziemlich gleichmäßig um 40 - 60 % an. Die segmentkernigen Granulozyten waren erst nach 48 bzw. 72 Stunden deutlich vermehrt, während Promyelozyten und Myelozyten regelmäßig schon nach 24 bis 48 Stunden leicht vermehrt gefunden wurden und sich erst danach wieder verminderten (Tab.C).

Das Megaloblastenmark (Versuch Nr. III) verhielt sich auch hier abweichend, da weder eine Zunahme der Granulopoese insgesamt noch der reifen Granulozyten beobachtet werden konnte.

Die Tabelle C ermöglicht ferner die Interpretation der G/E-Indices: Danach war der erniedrigte G/E-Index durch Zunahme der Erythropoese und nicht etwa durch Abnahme der Granulopoese bedingt. Für den Anstieg des G/E-Index in den älteren Kulturen waren sowohl die stark verminderte Erythropoese als auch die wachsende Population der Granulopoese verantwortlich.

Die übrigen Elemente des Knochenmarks waren in den Kulturen aus frischen Zellen nur gering vertreten. Es handelte sich vor allem um Lymphozyten, bzw. kleine lymphoide Retikulumzellen, um große Retikulumzellen und Plasmazellen. Wegen ihrer geringen Anzahl war ihr Verhalten in der Kultur schwer zu beurteilen, jedoch schienen diese Zellen während der ganzen Inkubationszeit unverändert (Tab.C).

K o n s e r v i e r t e Z e l l e n =====

a) Zellzählung (Tab.E):

Die eingefrorenen Knochenmarkzellen schienen nach dem Auftauen kaum geschädigt, wenn als Maßstab der Überlebensrate allein die Ergebnisse der Kammerzählung betrachtet wurden. Höchstens 15 % zerstörte Zellen wurden mit dieser Methode nachgewiesen.

b) Nativpräparate:

Auch im nativen Zustand sahen die meisten Zellen unmittelbar nach dem Auftauen intakt aus, aber nur selten war eine Bewegungsform zu finden. Mit der Phasen-Kontrast-Optik wurden bei einem Teil der Zellen typische Veränderungen sichtbar, die auf den Zelltod hindeuteten und die innerhalb von 30 min erheblich zunahmen: Der Kern hatte seine Struktur verloren, die Granula im Plasma waren verklumpt. Außerdem zeigte das Zytoplasma häufig blasige Auswüchse.

c) Differentialzählung (Tab.F):

Die Ausstriche von den gefrierkonservierten Zellen ergaben, verglichen mit der Kammerzählung, ein unerwartet schlechtes Bild. Außer den erythropoetischen Vorstufen waren nur wenige Zellen morphologisch intakt, der G/E-Index war dementsprechend mit 0,2 bis 0,5 extrem niedrig. Die Erythroblasten zeigten dabei normale Zellstrukturen und normales Färbeverhalten. Die einzige zytologisch erfaßbare Besonderheit war eine verstärkte "Öhrchen"- bzw. Blisterbildung bei den Proerythroblasten.

Tabelle F vergleicht die Ergebnisse der Differentialzählung der frischen Knochenmarksuspensionen mit den entsprechenden Zahlen nach dem Einfrieren und Wiederauftauen. Das den beiden Zuständen jeweils zugrunde liegende Hämoxyelogramm wurde durch Summation der Myelogramme aller sieben Versuche errechnet, um so Ände-

rungen in der relativen Zellverteilung zu verdeutlichen. Wegen der augenfälligen Diskrepanz zwischen dem Ergebnis der Kammerzählung und dem Myelogramm der aufgetauten Zellisuspension wurden hier keine absoluten Zellzahlen angegeben.

Die Tabelle zeigt deutlich, daß die prozentuale Verteilung der einzelnen Reifeklassen innerhalb der Erythropoese nach dem Einfrieren nicht verändert war. Die Erythroblasten wiesen offenbar in allen Reifestufen gegenüber dem Gefrierprozeß die gleiche Empfindlichkeit auf.

Erythroblastenmitosen wurden in allen Phasen gefunden, aber nur halb so oft wie in der frischen Zellsuspension (Roter Mitose-Index in Tab.F). Die Verteilung der Mitosephasen entsprach dabei etwa dem Zustand vor dem Einfrieren (Abb.11). Endphasen von Mitosen kamen nicht selten vor. Da die Ausstriche innerhalb von zehn Minuten nach dem Auftauen hergestellt wurden, war die Annahme begründet, daß die Mitosen durch den Gefrierprozeß arretiert worden waren. Allerdings läßt die niedrige Gesamtzahl der beobachteten Erythroblastenmitosen keine sicheren Aussagen zu.

Die Zellen der Granulozytopoese waren in den Ausstrichen der konservierten Suspension entsprechend dem stark erniedrigten G/E-Index (Tab.F) zu 75 bis 90 % zerstört. Sollte die Voraussetzung, daß die Erythropoese nicht wesentlich geschädigt wurde, nicht zutreffen, wäre ein noch höherer Prozentsatz der Granulozytopoese zerstört.

Besonders betroffen schienen die reiferen Granulozyten, die nur selten morphologisch intakt aussahen. Soweit sie differenziert werden konnten, waren sie erheblich lädiert mit undeutlichen Zellgrenzen und teilweise zerlaufenem Chromatinmaterial. Sie ähnelten damit oft gequetschten Zellen, waren jedoch auffällig von unversehrten Erythroblasten umgeben, während bei schlechter Aus-

strichtechnisch alle Zellarten mehr oder weniger lädiert aussahen. Lediglich Myeloblasten und Promyelozyten wurden öfter in unversehrtem Zustand - und gelegentlich in Mitose - gefunden. Doch schien ein großer Teil auch dieser Zellen zerstört zu sein.

Von den übrigen Knochenmarkselementen waren neben einigen Retikulumzellen besonders die Plasmazellen, Lymphozyten und auch die Monozyten und ihre Vorstufen morphologisch gut erhalten. In der relativen Vermehrung dieser Zellklassen (Tab.F) kam die Schädigung der Granulozytopoese ebenfalls zum Ausdruck.

Für das Bild, das die aufgetauten Knochenmarkzellen im Ausstrichpräparat boten, war es belanglos, ob die Suspension sofort nach dem Auftauen zentrifugiert oder ob sie vorher mit Nährlösung verdünnt wurde, um die Konzentration des DMSO zu reduzieren.

K u l t u r v e r s u c h e m i t k o n s e r v i e r - t e m K n o c h e n m a r k

=====

In den Kulturen des konservierten Knochenmarks zeigte sich eine eigentümliche Tendenz der Zellen, miteinander zu verkleben. Anfangs bildeten sich oft dicke Flusen und Klumpen, die auch durch intensive Pipettierung nicht aufgelöst werden konnten und die Zellzählung unmöglich machten. Wider Erwarten lösten sich diese Klumpen nach zwei bis vier Stunden von selbst auf. Nur im Versuch Nr.II dauerte dieser Vorgang länger, so daß der Zellgehalt erst nach 24 Stunden bestimmt werden konnte.

Sobald die Klumpen makroskopisch aufgelöst waren, fand man auch mikroskopisch bei der Kammerzählung

oder im Nativpräparat isolierte Zellen. Jedoch konnte man dann einen außerordentlich hohen Detritusanteil feststellen, der in der frisch aufgetauten Suspension mit denselben Untersuchungsmethoden nicht nachzuweisen war. Auch in Kulturen, in denen die Zellen anfangs gar nicht verklumpt waren (Versuch Nr. III, IV und VI), wurden in gleichem Ausmaß Zelltrümmer beobachtet.

a) Zellzählung (Tab.G, Abb.2):

In allen Kulturen von konserviertem Knochenmark nahm während der 48-stündigen Inkubationszeit die absolute Zellzahl ziemlich schnell und fast gradlinig ab. Sie lag nach 24 Stunden bei 70 bis 80 % und nach 48 Stunden zwischen 50 und 70 % des Ausgangswertes. Das Diagramm (Abb.2) zeigt den Unterschied im Vergleich mit der Entwicklung der Kontrollkulturen (Abb.1) sehr deutlich.

b) Nativpräparat:

Phasenoptisch sah man zwar auch nach 48 Stunden noch viele große und kleinere Blasten, die völlig intakt schienen, aber bis auf seltene Ausnahmen keine wandernden, reifen Zellen. Der anfangs hohe Detritusanteil nahm schon nach 24 Stunden deutlich ab. Der pH-Wert als grober Maßstab für die allgemeine Stoffwechselaktivität bewegte sich auch in Kulturen mit hohem Zellgehalt (z.B. Versuch Nr. IV) nur wenig zur sauren Seite (von pH 7,5 bis 7,7 auf pH 7,2 bis 7,5).

c) Differentialzählung (Abb.3-10), absolute Zahlen einzelner Zellklassen (Tab.H):

Die gefärbten Ausstriche der Kulturen aus konserviertem Knochenmark zeigten zu über 80 % der differenzier-

baren Zellen Erythroblasten aller Reifestufen, weniger als 10 % gehörten zur Granulopoese. Der G/E-Index war demnach, ähnlich wie beim frisch aufgetauten Knochenmark, sehr niedrig. Die übrigen Zellen teilten sich auf in Plasmazellen, Monozyten, zahlreiche Lymphozyten und - häufig phagozytierende - große Retikulumzellen (Abb.14-19).

Unter diesen Umständen konnten eindeutige und reproduzierbare Befunde über die Kultivierung des mit DMSO konservierten menschlichen Knochenmarks nur für die Erythropoese und die Megalopoese erhoben werden:

Wie bei den Kontrollkulturen kam es auch hier zur Rechtsverschiebung, jedoch nahm der Anteil der reifen Erythroblasten wenigstens am zweiten Tag schneller zu (Abb.3-6), so daß er nach 48 Stunden bis zu 80 % der gesamten Erythropoese einnahm (Abb.7 und 8).

Ebenso rasch verminderten sich die basophilen und polychromatischen Erythroblasten. Vor allem die starke Abnahme der polychromatischen Erythroblasten charakterisierte das unterschiedliche Verhalten der konservierten und der frischen Erythropoese in vitro, wie die statistische Auswertung der Reifungskurven zeigt (s.S.57).

Anhand der für die einzelnen Reifeklassen errechneten absoluten Zellzahlen (Tab.H) ließ sich die Vermehrung der reifen Erythroblasten um einen Faktor 4 - 40, der die entsprechenden Werte der Kontrollkulturen übertraf, eindeutig belegen. Im Zusammenhang mit diesem Befund waren der rasch sinkende Zellgehalt der Kultur und auch die abnehmende Zellzahl der gesamten Erythropoese besonders auffällig.

Ebenso fiel auf, daß sich die konservierten Proerythroblasten in vitro abweichend von den Kontrollkulturen verhielten, wie bereits in den Reifungskurven deutlich wurde. Bei Errechnung der absoluten Zahlen

zeigte sich in allen Fällen der Tabelle H entweder nach 24 oder nach 48 Stunden eine leichte Vermehrung der Proerythroblasten, während diese Zellen in den Kontrollkulturen allgemein rasch an Zahl abnahmen. Dabei wurde die deutlichste Zunahme bei den Promegaloblasten im Versuch Nr.III beobachtet, der auch sonst andere Resultate als die übrigen Versuche ergab (siehe unten).

Eine extreme Vermehrung der konservierten Proerythroblasten, wie es nach den Reifungskurven der Versuche Nr.V und VII (Abb.9 u.10) den Anschein hatte, ließ sich allerdings nicht feststellen: Lediglich im Versuch Nr.V nahm die Zahl der Proerythroblasten in der Kultur von $22/\text{mm}^3$ bis auf $40/\text{mm}^3$ zu, während sie im Versuch Nr.VII fast unverändert blieb. Insgesamt lag die beobachtete Vermehrung der konservierten Proerythroblasten in vitro noch im Rahmen zufälliger Abweichungsmöglichkeiten: Sie war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$ im Wilcoxon-Test, siehe Anhang).

Der mittlere Mitoseindex der aufgetauten Proerythroblasten in vitro entsprach etwa den Werten in den Kontrollkulturen (Tab.D). Anders als in den Kontrollkulturen stieg er aber am zweiten Kulturtag noch deutlich an. In den Versuchen Nr.IV A und B sowie Nr.VI wurden nach 48-stündiger Inkubation an jeweils 200 ausgezählten Proerythroblasten Mitoseindices von 70 bis 80 % ermittelt.

Um etwaige Störungen im Mitoseablauf zu erfassen, wurde die Verteilung der einzelnen Phasen aller ausgezählten Proerythroblasten-Mitosen in den Kulturen nach Einfrieren in einer karyologischen Kurve aufgezeichnet. Diese soll in Abb.13 wiedergegeben werden, obwohl Vergleichskurven für diese Zellklasse für die Originalsuspensionen oder Kontrollkulturen wegen der niedrigen Mitosezahlen nicht aufgestellt werden konnten. Ein

Vergleich ist nur mit den karyologischen Kurven von BOLL (17) möglich, denen diese Verteilung weitgehend entspricht.

Die basophilen Erythroblasten nahmen in den Kulturen des aufgetauten Knochenmarks - mit Ausnahme des Megaloblastenmarks - bereits am ersten Tag sehr rasch ab, während bei den polychromatischen Erythroblasten erst am zweiten Tag in vitro eine ebenso rasche Zellverminderung beobachtet wurde. Mit der - im Vergleich zu den Kontrollkulturen - schnelleren Eliminierung beider Zellklassen ging die stärkere Vermehrung der reifen Erythroblasten parallel.

Die Teilungsaktivität der konservierten basophilen Erythroblasten in vitro entsprach ebenfalls den Werten in den Originalsuspensionen und Kontrollkulturen, der Mitoseindex stieg, ebenso wie bei den Proerythroblasten, am zweiten Kulturtag an (Tab.D). Eine Ausnahme schienen die polychromatischen Erythroblasten zu bilden, deren Mitoseindex nach 48 Stunden wie in den Kontrollkulturen abfiel. Allerdings ist bei diesem Befund zu berücksichtigen, daß der Anteil dieser Zellklasse in der zwei Tage alten Kultur erheblich abgesunken war, dem errechneten Mitoseindex also niedrige Zellzahlen zugrunde lagen. Die orthochromatischen Erythroblasten schließlich wurden, genau wie in der frischen Zellsuspension und in der Kontrollkultur, nur selten in Mitose angetroffen. Der gesamte rote Mitoseindex war in der Kultur der konservierten Zellen zwei- bis viermal höher als unmittelbar nach dem Auftauen (Tab.D).

Karyologische Kurven für die gesamte Erythropoese wurden auch für die Kulturen von konserviertem Knochenmark aufgestellt (Abb.12). Aus den Kurven ließ sich jedoch keine Verschiebung der Mitosephasen-Verteilung ablesen, die auf eine Störung des Mitoseablaufs, verursacht etwa durch den Gefrierprozeß, hingewiesen hätte.

Zweikernige Erythroblasten aller Reifestufen kamen in den Kulturen zahlreicher vor als in der Suspension vor oder kurz nach dem Einfrieren, aber nicht eindeutig häufiger als in den Kontrollkulturen. Ihr Anteil innerhalb der Erythropoese erreichte 10 bis 15 %. Mehrkernige Proerythroblasten wurden nur in den Kulturen von konservierten Zellen gefunden, gelegentlich sah man sie auch in Mitose (Abb.18).

Das Megaloblastenmark entwickelte sich wie schon in den Kontrollkulturen auch nach Konservierung in vitro abweichend von den übrigen Knochenmarkproben. Verglichen mit den Kontrollkulturen kam es zwar, ebenso wie in den übrigen Versuchen, zu einer stärkeren Rechtsverschiebung. Aber die absolute Vermehrung der reifen Erythroblasten erreichte nicht dasselbe Ausmaß wie in den drei anderen berechneten Fällen (Tab.H).

Am auffallendsten war die deutliche Vermehrung der Promegaloblasten in den ersten 24 Stunden, auch basophile Megaloblasten nahmen an Zahl zu. Dadurch blieb die Zellzahl der Megaloblasten am ersten Kulturtag etwa konstant und sank erst nach 48 Stunden ab, während bei den Erythroblasten der übrigen Fälle eine Zellverminderung schon nach 24 Stunden auftrat.

Die Teilungsaktivität der Erythroblasten des konservierten Megaloblastenmarks erreichte in vitro ähnlich hohe Werte wie bei den anderen Fällen. Der mittlere Mitoseindex der Proerythroblasten betrug 51 % (bei 394 ausgezählten Zellen), 95 % (bei 42 ausgezählten Proerythroblasten) in der Kontrollkultur. Die Mitoseindices der konservierten basophilen Megaloblasten betrugen in der Versuchskultur 28 % (von 1146 Zellen) gegenüber 17 % (von 414 Zellen) in der Kontrollkultur. Eine Vermehrung der Mitosen mit zunehmender Inkubationsdauer ließ sich an konservierten Megaloblasten im Gegensatz zu den

Erythroblasten der übrigen Versuche nicht nachweisen.

Im Versuch Nr. III war ein direkter Vergleich zwischen verschiedenen Konservierungsdauern möglich. Nach den Versuchsergebnissen entwickelten sich jedoch die Zellen in den Kulturen nach 24-stündiger Konservierung ähnlich wie nach 7-tägiger Aufbewahrung (Tab.H).

Die Granulopoese war, wie auch an den absoluten Zahlenwerten (Tab.H) erkennbar, in den Kulturen des aufgetauten Knochenmarks kaum mehr vertreten. In den Ausstrichen wurden nur wenige Myeloblasten, Promyelozyten, Monoblasten (Promonozyten) und Monozyten gezählt. Dazu nahm die Gesamtzellzahl der Granulopoese in der Kultur sehr rasch ab. Gelegentlich kamen auch Mitosen von Promyelozyten vor, aus denen jedoch keine Mitoseindizes berechnet werden konnten.

Im übrigen waren in den Ausstrichen während der ganzen Inkubationsperiode große Retikulumzellen und Plasmazellen, vor allem aber Lymphozyten, bzw. kleine Retikulumzellen, zu finden. Eine Vermehrung etwa der lymphoiden Retikulumzellen war in den absoluten Zellzahlen nicht erkennbar.

In manchen Kulturen von aufgetauten Zellen, besonders aber in der zwei Tage alten Kultur des Versuchs Nr. VI, fielen basophile Blasten auf, die den durch Phytohaemagglutinin stimulierten Lymphozyten sehr ähnlich sahen und etwas willkürlich als Lymphoblasten eingeordnet wurden (Abb. 19). Nicht immer konnten diese Zellen aber gegen Proerythroblasten abgegrenzt werden, so daß eine endgültige Zuordnung nicht gelang, Mitosephasen kamen öfter vor.

Auch bei anderen Zelltypen wurde die Differenzierung bisweilen schwierig: Monozyten und Retikulumzellen waren wegen verschiedener Kernverformungen nicht regelmäßig voneinander zu trennen.

Z u s a m m e n f a s s u n g d e r E r g e b n i s s e

=====

1. In den Kontrollkulturen von frischen Knochenmarkzellen kam es mit Ausnahme von zwei Fällen in den ersten 48 Stunden zu einer Zellvermehrung um 10 bis 20 % (Abb.1). In drei berechneten Fällen nahm die Erythropoese am ersten Tag rascher zu als die Granulozytopoese, während sich letztere bis zum dritten Tag in vitro bei wieder abnehmender Erythropoese gleichmäßig weiter vermehrte. Die absolute Zahl der reifen Zellen stieg sowohl in der Erythropoese als auch in der Granulozytopoese während der Kultivierung erheblich an.

Mitosen aller Reifeklassen kamen während der gesamten Inkubationsperiode in ähnlicher Häufigkeit wie in den Originalsuspensionen vor.

Das Megaloblastenmark (Versuch Nr.III) zeigte in vitro, abweichend von den anderen Fällen, eine Vermehrung auch der basophilen Erythroblasten (Tab.C), gleichzeitig keine deutliche Zunahme der Granulozytopoese und insgesamt eine Verminderung der Zellzahl am zweiten und dritten Tag (Abb.1).

Beginnende Degenerationerscheinungen wurden an gefärbten Ausstrichen und in Nativpräparaten erst am dritten Tag in vitro beobachtet.

2. An gefrierkonservierten Knochenmarkzellen konnten mit Hilfe der Kammerzählung keine wesentlichen Veränderungen festgestellt werden (Tab.E). Im Nativpräparat waren jedoch häufig Zeichen einer Schädigung sichtbar, wie Plasmaverquellungen und fehlende Lokomotion. Am ungünstigsten waren die Ergebnisse

der Differentialzählung: Die Ausstrichpräparate der aufgetauten und zentrifugierten Zellen zeigten fast ausschließlich Erythroblasten in gleicher Differentialverteilung wie in der frischen Suspension, während die Granulozytopoese fast völlig fehlte.

3. Im Kulturversuch unterschieden sich die konservierten Zellen von frischen Zellen in folgenden Punkten:

- a) Die Zelldichte der Kulturen nahm während der Inkubation um etwa 30 - 50 % ab (Abb.2).
- b) Die Granulozytopoese trat innerhalb der 48 Stunden nicht wieder auf (Tab.H).
- c) Bei der Lebendbeobachtung wurden keine Wanderformen gefunden.
- d) Die Erythropoese zeigte nach 48 Stunden Inkubation im Differentialausstrich eine stärkere Rechtsverschiebung, dabei nahmen die Proerythroblasten, im Megaloblastenmark auch die basophilen Erythroblasten, nur wenig ab (Tab.H).
- e) Die Mitoseindices der konservierten Erythropoese erreichten die gleiche Höhe wie in den Kontrollkulturen (Tab.D).
- f) Nach 24 bis 48 Stunden wurden basophile teilungsfähige Zellen beobachtet, die nicht sicher eingeordnet werden konnten, morphologisch aber den durch Phytohaemagglutinin stimulierten Lymphozyten ähnelten.

D i s k u s s i o n

=====

Die Auffassung (8), daß die Kulturbedingungen bei Züchtung von Knochenmarkszellsuspensionen ungünstiger sind als bei der Koagulumkultur-Technik, z.B. in der Deckglaskultur nach Carrel (15), wird durch die vorliegenden Ergebnisse widerlegt. Die ermittelten Daten zur Proliferationskinetik der Erythropoese und der Granulozytopoese, die hier an drei Knochenmarkproben mit stark angeregter Erythropoese quantitativ dargestellt wurden, stimmen mit jenen Befunden gut überein, die BOLL (17) an einem umfangreichen Material mit Hilfe der Koagulumkultur-Technik erhoben hat. Beide Kulturmethoden führen zu einer gleichartigen Entwicklung der Differentialverteilung der einzelnen Zellklassen und zu denselben Änderungen des G/E-Index während der Inkubationszeit. Auch die beobachteten Mitoseindices als Parameter der Zellregeneration liegen auf vergleichbarem Niveau; geringe Abweichungen bei den basophilen und orthochromatischen Erythroblasten müssen auf Unterschiede im Ausgangsmaterial zurückgeführt werden. Die Granulozytopoese zeigt in der Suspensionskultur, vor allem nach längerer Inkubation, eine höhere Mitoseaktivität als in der Koagulumkultur (18). Da es gleichzeitig zu einer stärkeren Rechtsverschiebung kommt, liegt die Vermutung nahe, daß die leukopoetischen Vorstufen in der Suspensionskultur etwas besser ausreifen. Diese Beobachtungen stimmen mit den Befunden von EHR-LICH (34) überein.

Der entscheidende Vorteil der Suspensionskultur gegenüber der Koagulumkultur liegt in der Möglichkeit der quantitativen Zellzählung, da sich aus der Differential-

verteilung und dem gesamten Zellgehalt der Kultur für einzelne Reifungsklassen absolute Zellzahlen errechnen lassen. Damit wird die Proliferationskinetik von Knochenmarkzellen in vitro eindeutiger charakterisiert als mit Hilfe von Reifungskurven.

Die hier beobachtete Zellvermehrung von 10 bis 20 % innerhalb der ersten 48 Stunden stimmt mit Ergebnissen in der Literatur überein (119,141), die sich jedoch lediglich auf eine Vermehrung der Erythropoese beziehen, während über eine Zunahme der Granulozytopoese keine Angaben gemacht werden.

Aus den Zellzahlen der Tabelle C ergibt sich folgendes Bild:

Die Proliferation der Erythropoese ist in den ersten 24 Stunden durch eine starke Ausreifung mit absoluter Vermehrung der polychromatischen bis reifen Erythroblasten gekennzeichnet. Diese Vermehrung ist für die vorübergehende Erhöhung des G/E-Index verantwortlich. Am zweiten Tag in vitro nehmen die reifen Erythroblasten durch Ausreifung der jüngeren Vorstufen weiter zu und verlieren ihre Kerne, wie die sinkende Zellzahl der gesamten Erythropoese zeigt. Am dritten Tag ist das Reservoir der basophilen Vorstufen durch Ausreifung weitgehend erschöpft. Die Zahl der reifen Erythroblasten nimmt infolge Entkernung ab, wodurch sich die gesamte Zelldichte in der Kultur verringert (Abb.1).

Die Granulozytopoese nimmt während der gesamten Inkubationsperiode zahlenmäßig zu: Zunächst vermehren sich Promyelozyten und Myelozyten deutlich trotz gleichzeitiger Ausreifung zu segmentkernigen Granulozyten. Erst nach 72 Stunden tritt die Regeneration der Vorstufen gegenüber der weiteren Vermehrung der Granulozyten zurück; in den Reifungskurven resultiert eine Rechtsverschiebung. Die beobachtete Zellvermehrung entspricht

etwa den rechnerischen Voraussagen von BOLL und MERSCH (18) für die Verhältnisse in vivo.

Das abweichende Verhalten der Megalopoese in vitro (Versuch Nr.III) wird, übereinstimmend mit den Befunden in der Koagulumkultur (17), aus den absoluten Zellzahlen der Tabelle C deutlich: Durch starke Regeneration der basophilen Megaloblasten nimmt die Zelldichte in der Kultur am ersten Tag sehr rasch zu, um anschließend infolge Ausreifung der Erythropoese, aber auch wegen geringer Regeneration und Ausreifung der Megagranulopoese, ebenso schnell wieder abzunehmen. Der rote Mitoseindex des Megaloblastenmarks zeigt über die ganze Inkubationszeit eine lebhaftige Teilungsaktivität der Megaloblasten an.

Die Ergebnisse der Kultivierungsversuche mit frischen Knochenmarkzell suspensionen lassen deshalb die Schlußfolgerung zu, daß

- die Milieubedingungen der Suspensionskultur eine lebhaftige Proliferation sowohl der Erythropoese als auch der Granulopoese gestatten,
- die Suspensionskultur Rückschlüsse auf die Verhältnisse in vivo mit den gleichen Einschränkungen (42) erlaubt wie die hier länger erprobte Koagulumkulturtechnik,
- die Ergebnisse der Suspensionskultur in befriedigendem Maße reproduzierbar und quantitativ darstellbar sind.

Damit sind die Voraussetzungen gegeben, um dieses Verfahren zur quantitativen Beurteilung der Vitalität von konservierten Knochenmarkzellen verwerten zu können.

Konservierte Knochenmarkzellen

Bei der Untersuchung der Zellen unmittelbar nach dem Auftauen ergeben sich mit verschiedenen Methoden widersprüchliche Befunde. Während mit der Kammerzählung nach Säureverdünnung keine wesentliche Zellverminderung feststellbar ist (Tab.E) und in Nativpräparaten nur der kleinere Teil der Zellen morphologische Veränderungen aufweist, werden erhebliche Zellschädigungen in gefärbten Ausstrichen der aufgetauten Suspension sichtbar, die jedoch fast ausschließlich die Granulopoese betreffen. Dabei scheinen die anschließenden Kultivierungsversuche die Ergebnisse der Differentialzählung zu bestätigen.

Als Ursache dieser Zellschädigung kommen mehrere Faktoren in Frage:

1. Mechanische Alteration der Zellen durch die Manipulationen nach dem Auftauen,
2. chemisch-toxische oder osmotische Wirkung der Gefrierschutzsubstanz,
3. unmittelbare Zellschädigung durch den Gefrier- und Tauprozess.

Zu 1: In der Literatur (72,105,125) wird die Meinung vertreten, daß konventionelle Untersuchungsmethoden wie Kammerzählung und gefärbte Ausstrichpräparate zu niedrige Überlebensraten der konservierten Knochenmarkzellen vortäuschen, da im biologischen Experiment bei gleicher Konservierungstechnik erheblich günstigere Resultate erzielt werden. Als Ursache wird eine erhöhte mechanische Empfindlichkeit der aufgetauten Zellen angenommen, die eine besonders schonende Behandlung erfordere (104).

Nach den vorliegenden Versuchsergebnissen könnte das Zentrifugieren der aufgetauten Knochenmarksuspension

für die schwere Schädigung der Granulozytopoese verantwortlich gemacht werden; denn die Zellen wurden sowohl zur Herstellung der Ausstriche als auch zur Vorbereitung der Kulturen zentrifugiert, während die frischen Zellen vor der Inkubation nicht zusätzlich belastet wurden. Allerdings erwähnt die Literatur keine Verminderung der Granulopoese nach Zentrifugieren von frischen Markzellen (36,65,96,141), so daß höchstens eine vermehrte Empfindlichkeit der leukopoetischen Zellen nach dem Auftauen anzunehmen ist. Auch bei dieser Annahme bleibt noch die Frage offen, warum andere Zellgruppen, darunter die besonders verletzlichen Retikulumzellen, nach dem Auftauen nur wenig vermindert waren (Tab.F). Es muß bezweifelt werden, daß die Zellen der Granulopoese in den Versuchen nach dem Auftauen noch vital waren. Ihre Fragilität läßt sich als Ausdruck einer schweren Alteration durch den Konservierungsprozeß erklären.

Zu 2: Mit einer toxischen Wirkung des Gefrierschutzmittels auf die Knochenmarkzellen vor und nach dem Einfrieren muß nach Ansicht vieler Autoren gerechnet werden (23,29,106,111,121). PERSIDSKY und RICHARDS (111) fanden experimentell, daß DMSO in Konzentrationen von 5 bis 10 % bereits hochtoxisch ist und nach dem Auftauen der Zellsuspension sofort ausgewaschen werden muß. Trotz der besseren kryoprotektiven Wirkung von DMSO bevorzugten sie deshalb PVP als Gefrierschutzstoff. CAVINS (29) und BOURONCLE (23) beobachteten vor allem an den reifen Zellen der Granulopoese deutliche Veränderungen mit rascher Hemmung der Zellmotilität. Dagegen konnten andere Autoren die hohe Toxizität von DMSO nicht bestätigen (20,28,31,54). BORNHÖFT (20) fand auch nach längerer Inkubation von Knochenmark in einem Milieu mit 5 %igem DMSO-Zusatz keine sicheren Zellschä-

digungen. Weitere Befunde sprechen dafür, daß die Intoxikation der Zellen nach ausreichender Senkung des DMSO-Gehalts weitgehend reversibel ist (111,118,121). Bei zu rascher Verdünnung entsteht allerdings nach HOPPE (54), MERYMAN (94) und PEGG (106) ein erheblicher Zellverlust durch osmotischen Schock. Der umgekehrte osmotische Gradient beim Zusatz der Substanz wird nach DAVIES (31) gut toleriert.

In den hier gewählten Versuchsbedingungen wurden diese Erfahrungen berücksichtigt, die DMSO-Konzentration wurde nach dem Auftauen sogar stärker vermindert als in der Literatur empfohlen (2,111,121). Aus diesen Gründen ist nicht anzunehmen, daß die Verminderung der Granulopoese nach dem Auftauen lediglich Folge einer Intoxikation der Zellen durch das Gefrierschutzmittel ist.

Zu 3: Berichte aus der Literatur stützen die Vermutung, daß die in den Ausstrichpräparaten sichtbare Zerstörung der Granulozytopoese in erster Linie durch den Gefrierprozeß selbst verursacht wurde. Nach LEIBO und Mitarbeiter (68) sind in einer inhomogenen Zellpopulation wie im Knochenmark unterschiedliche Konservierungserfolge bei einer bestimmten Technik durchaus denkbar, da Kühlrate, Art und Konzentration des Gefrierschutzmittels für viele andere Gewebe unterschiedliche Optima aufweisen.

Eine niedrige Überlebensrate der leukopoetischen Zellen wurde allerdings auch unabhängig von der Art der kryoprotektiven Substanz beobachtet: PYLE und BOYER (121) sahen nach Konservierung von Knochenmark mit DMSO ebenso eine erhebliche Schädigung der Granulozyten wie LEWIS und Mitarbeiter (69), die Glycerin als Schutzstoff verwendeten. MALININ u.a. (85) fanden bei Konservierung

mit Glycerin eine zunehmende Verminderung der Granulopoese in Abhängigkeit von der Konservierungsdauer, während Lymphozyten und Erythroblasten weitgehend intakt blieben. Auch in Konservierungsversuchen mit peripherem Blut überlebten die Granulozyten kaum (131), während Lymphozyten eine hohe Gefriertoleranz zeigten (2,24,31). Andererseits sind gefrierkonservierte Granulozyten nach CAVINS (29) zur Phagozytose fähig. BOURONCLE (23) fand in Kulturversuchen und bei phasenoptischen Untersuchungen an Leukämiezellen eine viel größere Gefriertoleranz bei allen basophilen Blasten und bei Lymphozyten als bei reifen Granulozyten und Monozyten. Dagegen ließen sich in unseren Versuchen Monozyten wesentlich besser konservieren als segmentkernige Leukozyten.

Bei Phasenkontrast-Untersuchungen an aufgetauten Blut- und Knochenmarkzellen (84,114) wurden neben fehlender amoeboider Beweglichkeit auch gleichartige morphologische Veränderungen beschrieben, wie sie hier im Nativpräparat regelmäßig beobachtet werden konnten.

Aus den vorliegenden Versuchsergebnissen muß gefolgert werden, daß die Zellen der Granulozytopoese eine geringere Gefriertoleranz zeigen als die übrigen Knochenmarkselemente und gegen den toxischen Einfluß des DMSO empfindlicher sind. Es ist anzunehmen, daß diese Zellen unmittelbar nach dem Auftauen bereits nekrobiotisch, aber morphologisch noch weitgehend intakt waren und bei der Kammerzählung miterfaßt wurden.

Eine sichere Entscheidung dieser Frage ist jedoch nicht möglich, weil die konventionelle Zähltechnik eine Differenzierung zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen nicht zuläßt.

Um diesen Mangel der üblichen Kammerzählung auszugleichen, wurde mehrfach versucht, die überlebenden Zellen mit Vitalfarbstoffen zu kennzeichnen. Besonders geeignet erscheint der Farboxclusionstest mit Trypanblau oder Eosin nach SCHREK (133), da er an die intakte Funktion der Zellmembran gebunden ist und deshalb nach der gültigen Gefriertheorie eine Zellschädigung sofort erfassen müßte. Untersuchungen von PEGG (107) und CORNECI (30) sowie die Erfahrungen anderer Autoren (3,7,29,49) und auch eigene Versuche zeigten aber, daß diese Methode sehr unzuverlässig und stör anfällig ist und -selbst bei insuffizienten Konservierungsmethoden - günstige Resultate nur vortäuscht.

Auch die von PEGG (108 S.154) empfohlene Supravitalfärbung mit Acridin-Orange im physiologischen Milieu ist nach den Angaben von HATHAWAY (49) durch große Anfälligkeit gegenüber technischen Bedingungen belastet, so daß ihre Anwendung erst nach sorgfältiger Standardisierung der Methode sinnvoll ist.

RICHARDS (125), WITTE (144 S.47) und PEGG (105) sahen die phasenoptische Beurteilung der aufgetauten Zellen im Nativpräparat als befriedigende Kontrolle der Überlebensrate, obwohl die Autoren einräumten, daß verminderte Beweglichkeit der Zellen nicht gleichzeitig verminderte Proliferationsfähigkeit bedeute. Nach LOCHTE (72) sind die Ergebnisse der Kammerzählung mit Hilfe der Phasenkontrastoptik zuverlässiger als in der Standardtechnik.

Unsere eigenen Beobachtungen ergeben jedoch, daß eindeutige morphologische Veränderungen (Kern- und Plasmaödem) abgesehen von der fehlenden amoeboiden Beweglichkeit, sofort nach dem Auftauen mit der Phasenkontrastoptik noch nicht erkennbar sind, sich aber inner-

halb der ersten 30 Minuten entwickeln. Da diese Schwierigkeit nur durch längere Beobachtung einzelner Zellen bei starker Vergrößerung überwunden wurde, schien auch das Phasenkontrastverfahren zumindest für eine quantitative Zählung der überlebenden Zellen nicht geeignet.

Wegen der unzuverlässigen Ergebnisse der Kammerzählung läßt sich auch eine mögliche geringe Zellverminderung der Erythropoese nach dem Auftauen nicht sicher ausschließen. Die auffallende Kongruenz in der Differentialverteilung der erythropoetischen Vorstufen vor und nach der Konservierung (Tab.F) läßt aber vermuten, daß die Erythropoese durch den Gefrierprozeß und die anschließenden Manipulationen nicht wesentlich alteriert wird.

Über das Schicksal der gerade in Mitose befindlichen Zellen während des Einfrierens und nach dem Auftauen liegen in der Literatur keine Angaben vor. Anhaltspunkte für eine Störung des Mitoseablaufs vor und nach der Konservierung oder für eine Arretierung der Mitosen beim Einfrieren könnten sich aus karyologischen Kurven ergeben. Obwohl zuverlässige Aussagen wegen der niedrigen Mitosezahlen nicht möglich sind, läßt sich aus der Verteilung sämtlicher Erythroblasten-Mitosephasen nach der Konservierung keine wesentliche Verschiebung ablesen, die auf eine Mitosehemmung hinauslaufen könnte oder aber auf einen Neubeginn der Zellteilung nach dem Auftauen hinweisen könnte (Abb.12). Der niedrige rote Mitoseindex in den aufgetauten Suspensionen ließe sich scheinbar damit erklären, daß schon während der Abkühlung der Zellen Mitosen auslaufen, ohne daß neue Zellen ins Mitosestadium eintreten. Diese Störung müßte sich jedoch in einer Verminderung der Frühphasen der karyolo-

gischen Kurve zeigen. Da diese Verminderung nicht erkennbar ist, muß man eher eine vermehrte Lyse der Zellen während der Mitose als Ursache des niedrigen Mitoseindex nach dem Auftauen annehmen. Ebenso ist anzunehmen, daß die nach dem Auftauen gefundenen Mitosen durch den Gefrierprozeß arretiert wurden und nun weiterlaufen; denn vom Zeitpunkt des Auftauens bis zur Anfertigung der Ausstriche vergingen nur wenige Minuten.

Konservierte Knochenmarkzellen in vitro

Aus der vorliegenden Literatur sind keine quantitativen Angaben über die Proliferationskinetik von gefrierkonservierten Knochenmarkzellen in vitro ersichtlich. Verschiedene Autoren (37,72,113,121) berichteten lediglich über die Incorporation von markierten Nucleotiden oder Aminosäuren in vitro und schlossen daraus auf die erhaltene Fähigkeit der konservierten Zellen zur DNS- bzw. Proteinsynthese. Bei FRIEDMAN (41) findet sich ein kurzer Hinweis auf mitotische Aktivität von konservierten Knochenmarkzellen nach mehrtägiger Inkubation unter Phytohaemagglutinin-Stimulation, jedoch fehlen Angaben über Zellzahlen oder Mitoseindices. LEWIS und Mitarbeiter (69) untersuchten tiefgefrorene Mäuse-Knochenmarkzellen in einer intraperitoneal implantierten Diffusionskammer. Diese in vivo -Kultur zeigte nach 24 Stunden fast nur Detritus, am vierten Kulturtag aber überraschend eine lebhaftete Mitoseaktivität in der Erythropoese und Granulopoese mit Auftreten von reifen Granulozyten. Aus diesem Befund schlossen die Autoren auf eine verzögerte Regeneration der konservierten Zellen. Bei Kultivierung in vitro sahen sie dagegen weder bei der Erythropoese noch in der Granulozytopoese sichere Anzeichen einer Regeneration oder Reifung, so daß ihre

offenbar von der Kulturtechnik beeinflussten Ergebnisse nicht mit den unsrigen vergleichbar sind. Außerdem gestattete ihre Versuchsanordnung keine quantitative Auswertung.

Die hier vorgelegten Versuchsergebnisse zeigen jedoch, daß mit einfachen Untersuchungsmethoden wie Kammerzählung und Differentialzählung gefärbter Ausstriche weitgehende Aussagen über die Proliferationsfähigkeit von konservierten Knochenmarkzellen in vitro möglich sind. Aufgrund dieser Untersuchungen läßt sich eine Proliferation der Erythropoese nach Gefrierkonservierung eindeutig nachweisen, während eine regenerationsfähige und ausreifende Granulozytopoese fehlt.

Die Proliferation der aufgetauten Erythroblasten in vitro zeigt sich an ihrer Teilungsaktivität, an der absoluten Vermehrung der reifen Erythroblasten und der Änderung der Differentialverteilung in der übrigen Erythropoese (Tab.D u.H).

Verglichen mit den Kontrollkulturen bleibt die Regenerationsfähigkeit der Erythroblasten nach dem Auftauen, gemessen am Mitoseindex (Tab.D), vollständig erhalten und ist auch mit entsprechenden Werten in Ausstrichen von frischen Knochenmarkbröckchen vergleichbar (17). Auffällig ist, daß in den Kulturen der konservierten Zellen der gesamte rote Mitoseindex, und besonders der Proerythroblasten-Mitoseindex, stärker ansteigen als in den Kontrollkulturen. Da nach den karyologischen Kurven (Abb.12,13) den erhöhten Mitoseindices keine Hemmung einzelner Mitosephasen zugrunde liegen kann, muß hier eine Steigerung der Regeneration, speziell der Proerythroblasten, angenommen werden.

Diese Annahme scheint sich in der gleichbleibenden, teilweise sogar ansteigenden Zahl der Proerythroblasten zu bestätigen. In diesem Zusammenhang ist die Zellverminderung der Erythropoese in den Kulturen des konservierten Knochenmarks bemerkenswert. Während die Erythropoese in den Kontrollkulturen am ersten Tag um 30 bis 40 % zunimmt und danach etwa auf den Ausgangswert absinkt (Tab.C), vermindert sich die konservierte Erythropoese - mit Ausnahme der Megaloblasten - am ersten Tag in vitro um 10 bis 20 % und innerhalb von 48 Stunden um insgesamt 30 bis 40 % (Tab.H).

Diese unterschiedliche Entwicklung kann in zweifacher Weise gedeutet werden: Einmal als Zeichen einer beschleunigten Ausreifung zu Erythrozyten, die nicht mitgezählt werden; andererseits als Zeichen einer vermehrten Degeneration der Erythropoese infolge einer Gefrierschädigung der Zellen. Auf eine beschleunigte Zellreifung weist vor allem die gegenüber den Kontrollkulturen verstärkte Rechtsverschiebung der konservierten Erythropoese in vitro hin, der eine stärkere absolute Vermehrung der reifen Erythroblasten entspricht. Dabei sprechen die zahlreichen ausgestoßenen Kerne in den Ausstrichen gegen eine Entkernungshemmung der Erythroblasten als Ursache der Rechtsverschiebung. Die polychromatischen Erythroblasten reifen besonders am zweiten Kulturtag beschleunigt aus, während ihre Zahl am ersten Tag noch durch Ausreifung der basophilen Erythroblasten etwa konstant gehalten wird (Tab.H). Nach 48 Stunden ist das Reservoir dieser beiden Zellklassen weitgehend erschöpft, was in den Kontrollkulturen erst nach 72 Stunden der Fall ist.

Das konservierte Megaloblastenmark verhält sich ebenso wie im frischen Zustand in erster Linie wegen einer

erheblich gesteigerten Regeneration mit Vermehrung der basophilen Vorstufen von den anderen Knochenmarkproben abweichend. Entsprechend wird in den Kulturen am ersten Tag noch keine Verminderung der Megalopoese beobachtet (Tab.H).

Obwohl die Annahme einer beschleunigten Ausreifung begründet ist, kann auch eine vermehrte Degeneration von jungen Erythroblasten als Ursache der Rechtsverschiebung in der Verteilung der Reifestufen nicht sicher ausgeschlossen werden, vor allem da sie unabhängig von der gesteigerten Regeneration denkbar ist. Zur Klärung dieser Frage müßte die Zahl der ausgestoßenen Erythrozyten geschätzt werden, was mit der Retikulozytenzählung möglich wäre.

In der Literatur wird vor allem eine Zellschädigung durch den Gefrierschutzstoff diskutiert, da in den Kulturen noch ein Restgehalt an DMSO vorhanden ist. Verschiedene Beobachtungen an hämopoetischen Zellen (121) und an anderen Geweben (11,83,118) sprechen dafür, daß DMSO noch in geringer Konzentration die Proliferation in vitro hemmt, möglicherweise über einen Enzymblock in der DNS-Synthese. Die Angaben über die tolerierbaren Grenzkonzentrationen sind sehr unterschiedlich (20,111,121), liegen aber höher als 0,1 %. Da wir in unseren Kulturen keine Zeichen verminderter Regeneration sehen, ist ein toxischer Einfluß des Kulturmilieus wenig wahrscheinlich und bei einem DMSO-Gehalt von weniger als 0,1 % auch nach den Angaben der Literatur nicht zu erwarten.

Andererseits beobachtete SHERMAN (135,136) an eingefrorenen Asciteszellen und Nierengewebe in vitro eine

raschere Abnahme der Zellatmung und der Proliferationsrate als an frischen Zellen, was er als Zeichen einer "latenten Gefrierschädigung" auffaßte. Da er keine kryoprotektive Substanz benutzte, war ein chemisch - toxischer Einfluß ausgeschlossen. In diesem Sinn könnte auch für die vorliegenden Versuche ein vermehrter Zelluntergang in der Erythropoese durch den Gefrierprozeß erklärt werden.

Die Zerstörung der Granulozytopoese ist nach 24-stündiger Inkubation nahezu vollständig. Einzelne Myeloblasten und Promyelozyten werden zwar während der ganzen Inkubationszeit beobachtet, jedoch sind keine Anzeichen einer Regeneration erkennbar. Auch hieraus kann gefolgert werden, daß die meisten Zellen der Granulopoese unmittelbar nach dem Auftauen irreversibel geschädigt sind und daß in der Kultur nur noch die Lyse der Zellen beendet wird. Die absterbenden Zellen sind offensichtlich auch für die wiederholt beobachtete Klumpenbildung in der Kultursuspension verantwortlich, die nach verschiedenen Befunden (72,134,139) durch freigesetzte DNS verursacht wird.

Während bei unseren Versuchsbedingungen die Granulozyten gar nicht und die übrigen Zellen der Granulopoese kaum konservierbar sind, überstehen andere reife Knochenmarkselemente wie Lymphozyten, Plasmazellen und vor allem Monozyten den Gefrierprozeß auffallend gut und gehen auch anschließend in vitro nicht zugrunde.

Die sinkende Zelldichte in den Kulturen von konservierten Knochenmarkzellen (Abb.2) wird nach den hier diskutierten Ergebnissen hervorgerufen durch eine beschleunigte Ausreifung der Erythropoese, durch eine gering vermehrte Degeneration und Nekrobiose von Erythroblasten sowie vor allem durch das Fehlen einer sich vermehrenden Granulozytopoese. Als Ursache dieser drei Faktoren kommen veränderte Kulturbedingungen nicht in Frage, wohl aber die Alteration der Zellen durch den Konservierungsprozeß.

Die Identität und Bedeutung der großen basophilen, teilungsfähigen Zellen, die wir auch in Kulturen von gefrorenen Rattenknochenmarkzellen fanden und die den mit Phytohaemagglutinin stimulierten Lymphozyten ähnelten, konnten ohne zusätzliche Histochemie nicht geklärt werden. Sie wurden deshalb willkürlich den sonst kaum vorkommenden Lymphoblasten zugeordnet. Es ist nicht auszuschließen, daß es sich bei diesen Zellen, die in Kontrollkulturen niemals auftraten, lediglich um atypische Formen von Proerythroblasten oder Myeloblasten handelte; LEWIS und Mitarbeiter (69) beschrieben allerdings sowohl in Kulturen von gefrorenem als auch von frischem Mäuseknochenmark morphologisch ähnliche Zellen, die eine hohe Teilungsaktivität zeigten und augenscheinlich der Ausgangspunkt einer lebhaften Proliferation der konservierten Zellen waren. FLIEDNER, THOMAS und Mitarbeiter (39,40) nannten gleichartige Zellen, die sie nach Knochenmarktransplantationen im Markraum der Empfängerindividuen nachwiesen, mit gewisser Berechtigung "Stammzellen"; denn das Auftreten dieser Zellen stand in auffälligem zeitlichen Zusammenhang mit der Regeneration des Knochenmarks im bestrahlten Organismus.

Die hier gewählte Versuchsanordnung ermöglicht keine Überprüfung dieser Blasten hinsichtlich ihrer Funktion. Deshalb läßt sich nicht endgültig entscheiden, ob bei der verwendeten Konservierungsmethode trotz der schweren Alteration der Granulozytopoese der Strahlenschutzfaktor erhalten bleibt. Zwar kann nach den vorliegenden in vitro-Untersuchungen des Knochenmarks die Proliferationsfähigkeit der konservierten Erythropoese auch in vivo angenommen werden, aber sie muß für die Granulopoese zumindest bezweifelt werden. Vergleichende Untersuchungen in vitro und in vivo könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

Da nicht bewiesen werden konnte, daß die Granulopoese konservierbar ist, wird auch keine sichere Aussage über den Wert der beschriebenen Konservierungsmethode für klinische Zwecke ermöglicht. Tierexperimentell konnte jedoch gezeigt werden, daß alle Zellklassen des Knochenmarks den Gefrierprozeß tolerieren können und nach der Transplantation im Empfängertier nachweisbar sind. Diese Befunde lassen vermuten, daß die hier diskutierten Versuchsergebnisse durch technische Faktoren beeinflußt sind, die vor einer klinischen Anwendung der Methode verbessert werden müßten.

Z u s a m m e n f a s s u n g

=====

Da aus der Literatur bisher kaum morphologische Befunde über gefrierkonservierte menschliche Knochenmarkzellen und deren Proliferation ersichtlich sind, wurden Knochenmarkzellen nach Gefrierkonservierung in vitro untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden, inwieweit die Proliferationsfähigkeit des hämopoetischen Gewebes durch den Gefrierprozeß beeinträchtigt wird.

Von sieben Patienten ohne maligne hämatologische Erkrankungen wurden acht größere Knochenmarkproben entnommen und daraus homogene Zellsuspensionen hergestellt. Von jeder Probe wurde ein Teil der Suspension nach Zusatz von 10 % DMSO in einer Gefriertruhe langsam eingefroren und bei -88°C 24 Stunden bis sieben Tage lang aufbewahrt. Die aufgetauten Zellen wurden ebenso wie frische Zellen derselben Probe in Suspensionskulturen 48 Stunden inkubiert. Ihre Proliferation in vitro wurde mit Hilfe von Kammerzählungen und Differentialzählungen gefärbter Ausstriche verfolgt und mit dem Verhalten der frischen Zellen in den Kontrollkulturen verglichen.

Die Untersuchung der Zellen nach dem Auftauen ergab eine weitgehend vitale Erythropoese, die in vitro eine lebhafte Regeneration und eine etwas beschleunigte Ausreifung zeigte. Wesentliche, durch den Gefrierprozeß bedingte, Zellschädigungen wurden nicht beobachtet.

Demgegenüber war nach dem Einfrieren eine regenerationsfähige und reifende Granulopoese nicht mehr nachweisbar. Insbesondere wurden die Granulozyten durch den Konservierungsprozeß völlig zerstört, während Monozyten als einzige Zellklasse der Granulopoese auffallend gut

konserviert waren. Entsprechend diesen Befunden wurden im Nativpräparat mit dem Phasenkontrastmikroskop keine Wanderformen beobachtet.

Von den übrigen Knochenmarkzellen erwiesen sich lymphozytäre, plasmazelluläre und retikuläre Elemente nach dem Auftauen als vital.

Mehrfach und nur in Kulturen von konservierten Knochenmarkzellen wurden nicht identifizierbare "Blasten" beobachtet, die PHA-stimulierten Lymphozyten glichen. Die Bedeutung dieser Zellen wird diskutiert.

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie EURATOM-GSF, Nr.031-64-1 BIAD.

Statistische Berechnungen

Es ist zu prüfen, inwieweit folgende Ergebnisse durch zufällige Fehler beeinflusst sein können.

1. Die Veränderung des Gesamtzellgehaltes in Kulturen von frischem (Abb.1, Tab.B) und konserviertem (Abb.2, Tab.G) Knochenmark innerhalb der ersten 24 Stunden.
2. Die absolute Vermehrung der konservierten Proerythroblasten in vitro (Tab.H).
3. Die stärkere Rechtsverschiebung der konservierten Erythropoese nach 48 Stunden Inkubation, verglichen mit der nicht konservierten Erythropoese in vitro (Abb.3 - 6).

Zu 1: Aus der Kurvenschar der Abb.2 geht einleuchtend hervor, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Zelldichte der konservierten Knochenmarkzellen in vitro abnimmt. Auch bei dem zugrunde liegenden kleinen Stichprobenumfang von $N = 8$ Versuchen ist die Wahrscheinlichkeit, daß diese Verminderung nur zufallsbedingt ist, gering: Bei Anwendung des Zeichentestes (44 S. 105) findet man für $N = 8$ die Vertrauensgrenzen 0-8, denen eine Irrtumswahrscheinlichkeit $2\alpha = 0,01$ entspricht.

Bei der Zählung der Kontrollkulturen (Abb.1, Tab.B) mußten zwei Verlaufskurven (Vers.Nr.II und V) eliminiert werden, da sie durch ungünstige Milieubedingungen verfälscht waren (s.S.24). Nach Bereinigung der Stichprobe ergibt der Zeichentest, daß bei $N = 8$ die zur Irrtumswahrscheinlichkeit $2\alpha = 0,05$ gehörenden Vertrauensgrenzen 0-6 berührt werden.

Zu 2: Die nachstehende Tabelle zeigt, daß es nur in 5 von 8 Kulturen zu einer absoluten Vermehrung von konser-

vierten Proerythroblasten kam. Bei diesem Ergebnis läßt sich allein mit dem Zeichentest keine signifikante Zellvermehrung nachweisen. Es wird deshalb der Wilcoxon-Test angewendet (44, S. 126): Nach Rangierung der prozentualen Differenzen lautet die Rangsumme der positiven Differenzen (entspr. einer Zellzunahme) $T^+ = 25$. Sie erreicht damit jedoch nicht die einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ entsprechende Schwelle von $T^+ = 31$, so daß auch der Wilcoxon-Test keinen signifikanten Unterschied aufzeigt.

Versuch Nr.	Zahl der PE pro mm^3		Differenzen in %		Rang- nummer
	0 h	24 h	+	-	
I	24	13		46	6
III (1d kons.)	138	194	41		<u>5</u>
III (7d kons.)	149	275	85		<u>7</u>
IV A	251	217		14	2
IV B	463	376		19	3
V	20	57	185		<u>8</u>
VI	49	63	29		<u>4</u>
VII	26	29	12		<u>1</u>

Rangsumme der positiven
Differenzen $T^+ = 25$

Zu 3: Die unterschiedliche Häufigkeitsverteilung der konservierten und der nicht konservierten Erythropoese, die nach 48 Stunden am deutlichsten zum Ausdruck kommt (Abb. 3 - 6), kann mit dem χ^2 -Verfahren nach Pearson statistisch überprüft werden. Der Test geht von der Annahme aus, daß die unterschiedlichen Häufigkeiten zufälliger Art sind, die Stichprobenpaare also derselben Grundgesamtheit entstammen (Nullhypothese).

Unter dieser Bedingung läßt sich die Abweichung der beobachteten Zellzahlen von Erwartungswerten bestimmen, die aufgrund der Nullhypothese aufgestellt werden können. Die Summe χ^2 der einzelnen Abweichungsmaße muß bei Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes zwischen beiden Stichproben einen vorgegebenen Zahlenwert erreichen. Dieser Wert ist abhängig vom Signifikanzniveau und der Zahl der Freiheitsgrade und kann aus Tabellen entnommen werden (44 S.36 ff).

χ^2 errechnet sich aus:

$$\chi^2 = \sum \frac{(B_k - E_k)^2}{E_k} + \sum \frac{(B_v - E_v)^2}{E_v}$$

Dabei bedeuten:

B_k, B_v beobachtete Häufigkeiten der erythropoetischen Reifestufen in den Kontrollkulturen (B_k) und den Kulturen von konserviertem Knochenmark (B_v), jeweils nach 48 Stunden Inkubation.

E_k, E_v die zu B_k und B_v gehörenden Erwartungswerte, errechnet aus der relativen Häufigkeit p einer Zellklasse in der vereinigten Stichprobe $\sum B_k + \sum B_v$, multipliziert mit dem Umfang B_k bzw. B_v jeder der beiden Stichproben. Dabei gilt: $E_k + E_v = B_k + B_v$.

$$\frac{(B_k - E_k)^2}{E_k}, \frac{(B_v - E_v)^2}{E_v}$$

Abweichungsmaße der einzelnen Beobachtungswerte von den zugehörigen Erwartungswerten.

Durchgerechnetes Beispiel: Vers.Nr.VI A (Abb.4):

	B_k	B_v	B_k+B_v	p	E_k	E_v	$\frac{(B_k-E_k)^2}{E_k}$	$\frac{(B_v-E_v)^2}{E_v}$
PE	16	138	154	0,1162	50,66	103,34	23,71	11,63
bE	94	74	168	0,1268	55,28	112,72	27,10	12,42
pE	115	16	131	0,0989	43,12	87,88	119,82	58,81
oE	56	35	91	0,0687	29,95	61,05	22,66	11,12
rE	155	626	781	0,5894	256,99	524,10	40,47	19,89
Summe	436	889	1325	1,0000	436,00	889,00	233,76	113,87

$$\chi^2 = 233,76 + 113,87 = 347,63$$

Bestimmung der Freiheitsgrade:

$$v = (\text{Zahl der Merkmalsklassen (=Zellklassen)} - 1)$$

$$= (5 - 1) = 4$$

$$v = (5-1) \cdot (2-1) = 4$$

Nach der Pearson-Verteilung ergibt sich für $\chi^2=347,63$ bei 4 Freiheitsgraden eine Irrtumswahrscheinlichkeit $2\alpha = 0,001$, d.h. der Unterschied zwischen beiden Stichproben ist statistisch hochsignifikant. Dabei läßt die Höhe der einzelnen Abweichungsmaße erkennen, daß für die unterschiedliche Differentialverteilung vor allem die polychromatischen, weniger die reifen Erythroblasten verantwortlich sind.

Für die Versuche III, IV B und VI (Abb.3,5,6) sind die einzelnen Abweichungsmaße und χ^2 -Werte auf der folgenden Seite tabellarisch zusammengestellt.

In allen Fällen überschreiten die χ^2 -Werte die einem Signifikanzniveau $2\alpha = 0,001$ entsprechenden Vertrauensgrenzen, die unterschiedliche Differentialverteilung der frischen und der konservierten Erythropoese in vitro ist also mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zufallsbedingt. Ebenso geht aus der Tabelle hervor, daß die polychromatischen Erythroblasten in erster Linie für diesen Unterschied verantwortlich sind.

	Versuch III (1 d kons.) $\frac{(B_k - E_k)^2 (B_v - E_v)^2}{E_k E_v}$	Versuch III (1 d kons.) $\frac{(B_k - E_k)^2 (B_v - E_v)^2}{E_k E_v}$	Versuch IV B $\frac{(B_k - E_k)^2 (B_v - E_v)^2}{E_k E_v}$	Versuch VI $\frac{(B_k - E_k)^2 (B_v - E_v)^2}{E_k E_v}$
PE	2,73 1,28	8,74 4,04	44,19 16,36	3,01 1,69
bE	22,41 10,46	7,90 3,66	5,83 2,18	20,41 11,33
pE	3,35 1,56	83,25 38,45	105,03 38,11	89,69 49,75
oE	0,00 0,00	6,50 2,93	3,42 1,28	2,48 1,38
rE	25,80 12,05	43,35 20,07	11,78 4,36	27,26 15,14
$\sum$	54,29 25,35	149,74 69,15	168,25 63,29	142,85 79,28
χ^2	79,64	218,89	231,54	213,13

Tabellen und Abbildungen

Erläuterung der verwendeten Abkürzungen

Zellklassen:

PE	= Proerythroblast
bE	= basophiler Erythroblast
pE	= polychromatischer Erythroblast
oE	= orthochromatischer "
rE	= reifer "
Myb	= Myeloblast
Prom	= Promyelozyt
(eos) Myc	= (eosinophiler) Myelozyt
Mob	= Monoblast
MM	= Metamyelozyt
Stab	= stabkerniger Granulozyt
(eos) Segm	= (eosinophiler) segmentkerniger Granulozyt
Moc	= Monozyt
Ret	= große Retikulumzelle
Plas	= Plasmazelle
Lyb	= Lymphoblast
Lyc	= Lymphozyt
rMI	= roter Mitose-Index (= Mitosezahl unter 1000 teilungsfähigen Erythroblasten)
wMI	= weiter Mitose-Index
G/E-Index	= quantitatives Verhältnis der Granulopoese zur Erythropoese

Mitosephasen:

P	= Prophase
fM	= frühe Metaphase
sM	= späte Metaphase
A	= Anaphase
T	= Telophase
R	= Rekonstruktionsphase

Erläuterung der Reifungskurven (Abb.3-10)

Die prozentualen Anteile der einzelnen Zellklassen innerhalb der Erythropoese und der Granulopoese sind entlang der Abszisse oben unter den zugehörigen Symbolen addierend aufgetragen.

Die Ordinate repräsentiert die Inkubationsdauer der Kulturen in Stunden.

Die zeitliche Veränderung des relativen Anteils jeder Zellklasse mit zunehmender Inkubationszeit ist entsprechend der Breite der zugehörigen, durch zwei Linien begrenzten Felder von oben nach unten ablesbar.

Versuch Nr.	Pat. Alter	Klin.Diagnose	Therapie vor KM-Punktion	Zytolog. KM-Befund	Gesamtzell- ertrag	Konservie- rungsdauer
I	L.R. 45	Tumoranämie b. Uterus-Sarkom	nicht bekannt	angeregte Erythropoese	55 x 10 ⁶	24 h
II	E.O. 61	blutende Hia- tushernie	ohne	angeregte Erythropoese	35 x 10 ⁶	24 h
III	E.K. 76	Malabsorptions- syndrom	Novaminsulfon, Chlormethiazol, Digoxin	Megaloblasten- mark	370 x 10 ⁶	24 h u. 7 d
IV A,B	M.S. 74	blütendes Colon-Ca	ohne	extrem anger. Erythropoese	175 x 10 ⁶	24 h
V	M.F. 64	Verd. auf Nieren-Tbc	Digoxin	anger.E.poeese, monocyt.Reakt.	60 x 10 ⁶	24 h
VI	E.L. 63	Leberparenchym- schaden bei Alkoholismus	Chlormethiazol, Reserpin, Vit.K	anger.E.poeese, Retikulumszell- vermehrung	60 x 10 ⁶	3 d
VII	K.L. 54	akuter Infekt	Chloramphenicol, Gentamycin, Digoxin	normaler Befund	25 x 10 ⁶	7 d

Tabelle A: Herkunft des Untersuchungsmaterials

Versuch Nr.	Beginn	24 h	48 h	72 h
I	3,11	3,69	3,79	3,99
II	2,16	2,01	1,88	1,70
III	3,26	3,87	3,26	2,70
IV A	3,36	3,72	3,92	3,40
IV B	3,26	3,77	3,85	3,49
V	1,35	1,44	1,22	1,12
VI	1,91	2,20	2,33	2,16
VII	1,37	1,54	1,59	1,54

Tabelle B: Gesamtzellgehalt (in $1000/\text{mm}^3$)
in Kulturen von frischen KM-Zellen

Versuch Nr.	PE	bE	pE	oE	rE	Erv. poese	rMI %	G/E Ind	Myb	Prom	Myc	eos	Mob	MM	Stab	Segm	eos	Moc	Gran- poese	wMI %	Ret	plas	Lyb	Lyc
III (Megalo- blasten- mark)	121	543	224	43	62	993	25,2	2,1	43	326	380	156	13	116	348	560	72	46	2060	8,6	55	13	-	134
	92	994	445	58	147	1736	25,3	1,0	31	420	446	27	4	113	285	439	27	19	1811	7,2	27	19	4	279
	45	361	502	64	211	1183	30,0	1,5	13	448	287	79	7	49	147	768	38	26	1862	10,2	39	16	-	167
	5	49	311	68	192	625	11,8	3,0	8	326	400	68	-	97	146	711	43	27	1826	8,5	32	35	2	180
	124	627	714	26	10	1501	30,6	1,1	17	285	379	114	13	104	230	390	54	13	1599	10,8	34	43	-	174
IVA	89	453	750	418	191	1901	17,4	0,9	4	426	537	30	-	63	78	516	40	17	1711	9,4	4	22	-	86
	52	301	366	175	510	1404	3,6	1,6	12	445	803	78	4	55	120	638	78	34	2358	6,7	-	8	-	145
	37	44	118	62	291	552	20,8	4,9	3	537	638	34	3	51	139	1245	17	17	2684	13,1	24	27	-	108
IVB	62	680	636	13	23	1414	21,4	1,1	20	316	284	81	29	80	343	316	49	26	1544	11,0	56	78	-	173
	124	637	780	185	162	1888	17,5	0,9	15	592	608	53	4	49	53	335	19	15	1743	22,9	-	37	4	111
	32	174	413	90	410	1119	9,5	2,3	13	597	690	93	-	87	155	886	44	23	2588	9,1	-	39	-	108
	14	81	206	101	300	702	5,9	3,7	14	462	581	96	-	89	153	1078	68	25	2566	12,0	25	21	8	183
VI	36	195	216	103	42	592	18,0	2,0	12	298	207	84	6	86	261	132	61	30	1177	4,8	28	18	-	92
	24	183	266	91	262	826	31,3	1,5	22	290	266	26	11	66	119	396	15	22	1233	25,8	-	6	-	137
	16	140	271	91	370	888	19,3	1,4	9	390	357	49	9	82	49	263	30	23	1261	24,7	21	14	-	152
	9	75	123	39	148	394	22,6	4,0	4	202	272	55	-	70	124	751	66	19	1563	18,2	85	27	-	98

Tabelle C: Absolute Zellzahlen (Zellgehalt pro mm³)
in Kulturen von frischen KM-Zellen.

Jeweils untereinander:
0, 24, 48, 72 Stunden Inkubation

	Original- suspension	MI ‰	direkt nach Auftauen	MI ‰	Kontroll- Kulturen	MI ‰	Konserven- Kulturen	MI ‰
<u>PE</u>	6/132 =	45	9/ 397=	23	9/ 136 =	66	56/1166 =	48
24h					8/ 80 =	100	19/ 585 =	33
48h					1/ 32 =	31	37/ 581 =	64
72h					0/ 24 =	0		
<u>bE</u>	18/893 =	20	15/1704 =	9	17/ 744 =	21	23/1052 =	22
24h					12/ 442 =	27	13/ 675 =	19
48h					4/ 216 =	19	10/ 377 =	27
					1/ 86 =	12		
<u>pE</u>	23/998 =	23	14/2008 =	7	16/1182 =	14	34/2288 =	15
24h					8/ 621 =	13	32/2033 =	16
48h					3/ 374 =	8	2/ 255 =	8
72h					5/ 187 =	27		
<u>oE</u>	0/ 164 =	0	0/ 445 =	0	0/ 446 =	0	1/ 886 =	1
24h					0/ 236 =	0	1/ 491 =	2
48h					0/ 128 =	0	0/ 395 =	0
					0/ 82 =	0		
r, MI	47/2187 =	22	38/4554 =	8	42/2508 =	17	114/5392 =	21
24h					28/1379 =	20	65/3784 =	17
48h					8/ 750 =	12	49/1608 =	31
72h					6/ 379 =	16		

Tabelle D: Mitoseindices (MI) der einzelnen Reifungsklassen der Erythropoese. Gesamtzahlen aus Versuchen I + II, IV - VII.

Versuch Nr.	vor dem Einfrieren	nach dem Auftauen
I	27,4	23,6
II	17,3	16,1
III (1 d konserv.)	37,5	29,9
III (7 d konserv.)	37,5	34,2
IV A	13,1	12,7
IV B	13,1	13,2
V	6,4	6,2
VI	18,3	16,5
VII	11,2	10,2

Tabelle E: Gesamtzellgehalt (in $1000/\text{mm}^3$)
der KM-Suspensionen vor und nach
dem Einfrieren.
(Die Werte nach dem Auftauen wur-
den wegen des DMSO-Zusatzes rech-
nerisch korrigiert).

	vor		nach	
	dem Einfrieren			
Proerythroblasten	7	%	8	%
basoph. Erythrobl.	38	%	37	%
polychrom. "	39	%	38	%
orthochrom. "	7	%	8	%
reife "	9	%	9	%
roter Mitose-Index	20	%o	9,8	%o
Myeloblasten	1,5	%	3,5	%
Promyelozyten	17	%	14	%
Myelozyten	22	%	30	%
Eos. Myelozyten	5	%	5,5	%
Meta- "	6	%	5	%
Stabkernige	20	%	10	%
Segmentkernige	23	%	19	%
Eos. Segmentkernige	3	%	4	%
Monoblasten	0,5	%	1	%
weißer Mitose-Index	12	%o	3	%o
G/E-Index	2,1	%o	0,4	%o
Gr. Retikulumzellen	12	%o	9	%o
Plasmazellen	11	%o	28	%o
Lymphoblasten	0,1	%o	1,4	%o
Lymphozyten	37	%o	72	%o

Tabelle F: Differentialzählung vor und nach dem Einfrieren.

Veränderungen von G/E-Index, der relativen Zellverteilung innerhalb der Erythropoese und Granulozytopoese, sowie der relativen Häufigkeit der übrigen Zellen in der konservierten Knochenmarksuspension.

Mittelwerte aus allen Versuchen.

Versuch Nr.	Beginn	24 h	48 h
I	0,62	0,47	0,32
II	verklumpt	0,29	0,12
III (1 d konserv.)	2,90	2,00	1,49
III (7 d konserv.)	2,62	2,19	1,33
IV A	3,30	2,32	1,87
IV B	4,03	3,25	2,90
V	0,70	0,58	0,48
VI	0,96	0,82	0,70
VII	0,78	0,61	0,47

Tabelle G: Gesamtzellgehalt (in $1000/\text{mm}^3$)
in Kulturen von gefrierkonser-
vierten KM-Zellen

Versuch Nr.	PE	bE	pE	CE	rE	Erv. poese	rMI %	G/E Ind	Myb	Prom	Myc	eos	Mob	HM	Stab	Segm	eos	Moc	Gran. poese	Ret	Plas	Lyb	Lyc
III 1d kons. (Megaloblasten- mark)	138	774	499	84	137	1632	15,3	0,6	41	167	123	66	-	52	194	254	41	20	958	38	32	3	234
	194	928	252	82	140	1596	26,6	0,1	8	14	18	-	8	-	2	6	8	32	96	12	64	4	224
	78	174	392	60	441	1145	24,5	0,04	16	14	9	1	-	-	-	-	-	6	51	15	15	11	263
III 7d kons. (Megaloblasten- mark)	149	794	401	66	104	1514	20,5	0,5	18	127	93	76	-	39	102	229	21	13	718	42	91	-	254
	275	746	353	113	202	1689	29,4	0,1	15	17	23	4	13	-	2	11	17	44	136	13	77	9	263
	94	201	116	102	445	958	10,8	0,08	-	7	5	-	18	1	3	3	-	26	63	7	40	13	246
IVA	251	1003	1082	181	26	2543	3,8	0,15	-	26	190	-	-	3	-	88	10	26	343	7	105	-	303
	217	94	1141	180	312	1944	11,0	0,01	5	2	-	2	-	-	-	-	-	12	21	5	44	9	300
	243	126	28	61	1083	1541	57,0	0,05	4	10	8	2	6	-	-	-	-	53	83	6	52	9	184
IVB	463	1319	1223	261	44	3313	4,4	0,1	12	16	173	12	12	-	12	48	-	63	348	-	77	0	298
	376	412	818	282	1018	2906	17,5	0,01	10	13	-	-	3	-	-	-	-	29	55	3	16	7	266
	550	223	176	177	1305	2371	29,6	0,04	9	23	-	-	9	-	-	-	-	55	96	3	35	9	283
VI	49	221	307	119	55	751	20,0	0,2	8	30	22	-	3	4	9	4	12	34	130	5	21	-	58
	63	96	359	55	102	675	31,0	0,07	11	4	-	-	8	-	-	3	-	25	51	4	53	-	38
	19	27	20	61	342	469	34,0	0,1	6	11	2	-	2	-	-	3	-	41	65	7	52	13	97

Tabelle H: Absolute Zellzahlen (Zellgehalt pro mm³)
in Kulturen von konservierten KM-Zellen.

Jeweils untereinander:

O, 24, 48 Stunden Inkubation.

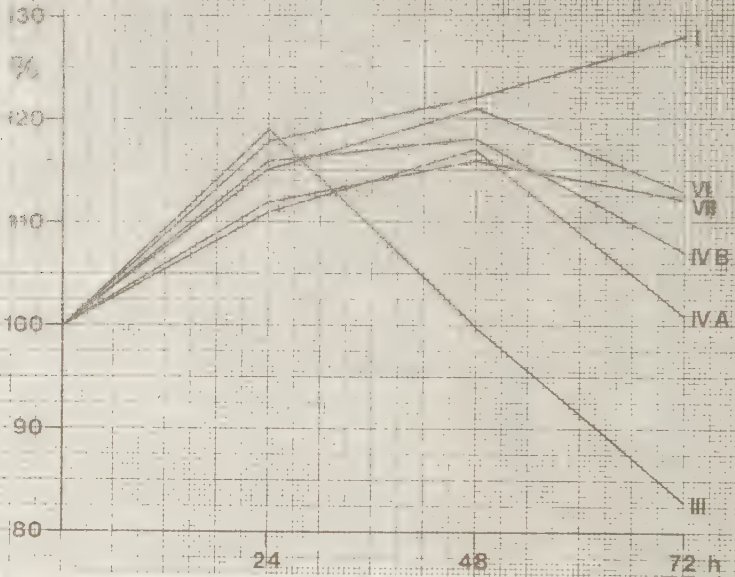


Abb. 1: Gesamtzellgehalt in Kulturen von frischem Knochenmark.
 Ordinate: Zelldichte in Prozent vom Ausgangswert.
 Abszisse: Inkubationsdauer in Stunden.
 Versuchsnummern in römischen Ziffern.

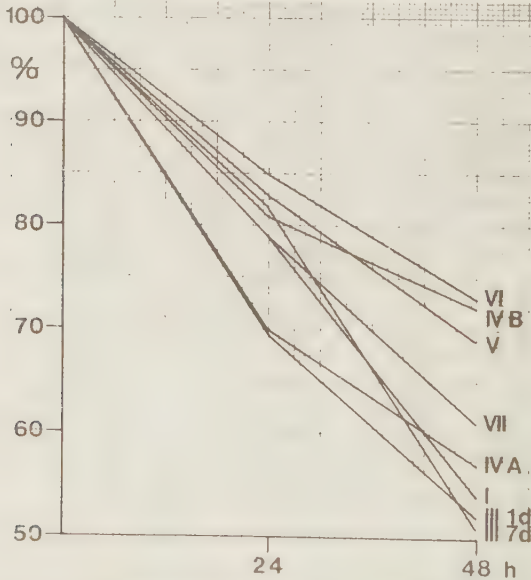


Abb. 2: Gesamtzellgehalt in Kulturen von konserviertem Knochenmark. Erklärung s. Abb. 1.

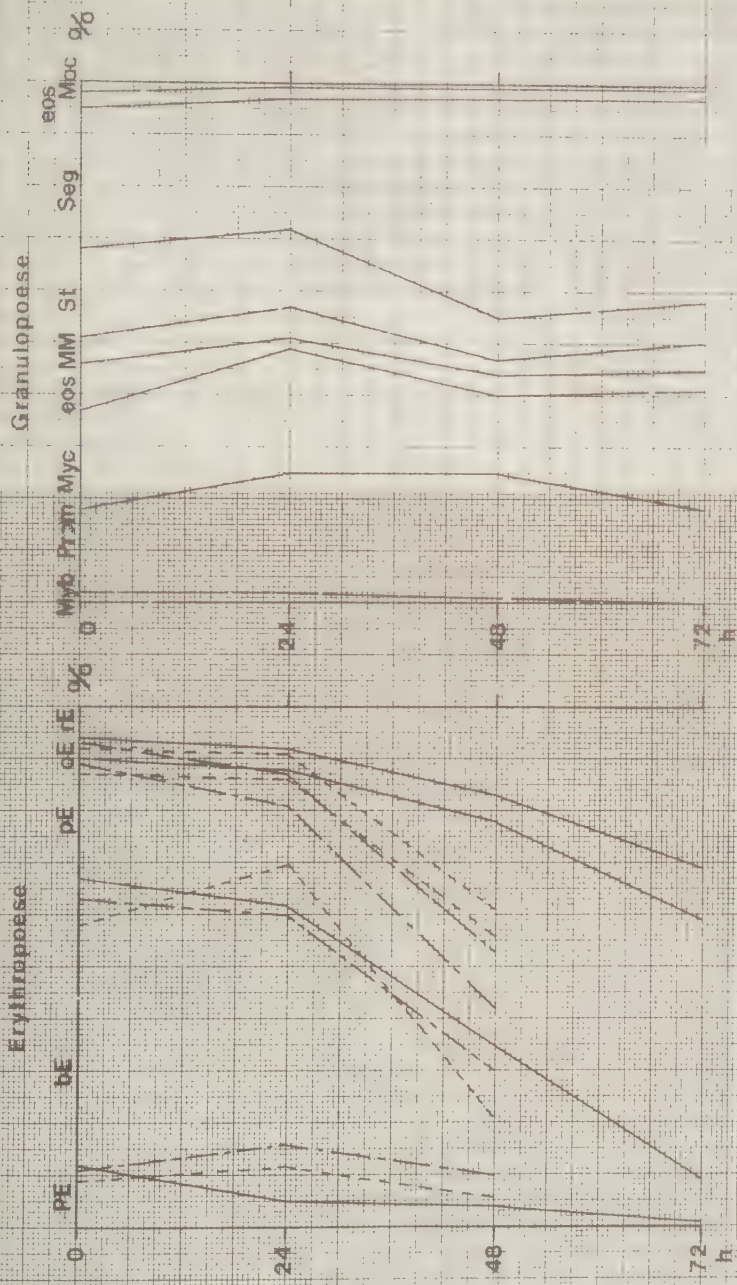


Abb. 3: Vers. Nr. III, Reifungskurven von frischem (—), 1 Tag (---) und 7 Tage (---) konserviertem Knochenmark (Megaloblastenmark).
Dargestellt ist die Differentialverteilung der Erythropoese und Granulopoese in Prozent und ihre Änderung mit zunehmender Inkubationszeit. Die konservierte Granulopoese wurde wegen zu niedriger Zellzahl nicht berücksichtigt. Erläuterung der Symbole und der graphischen Darstellung s. S. 62 u. 63.

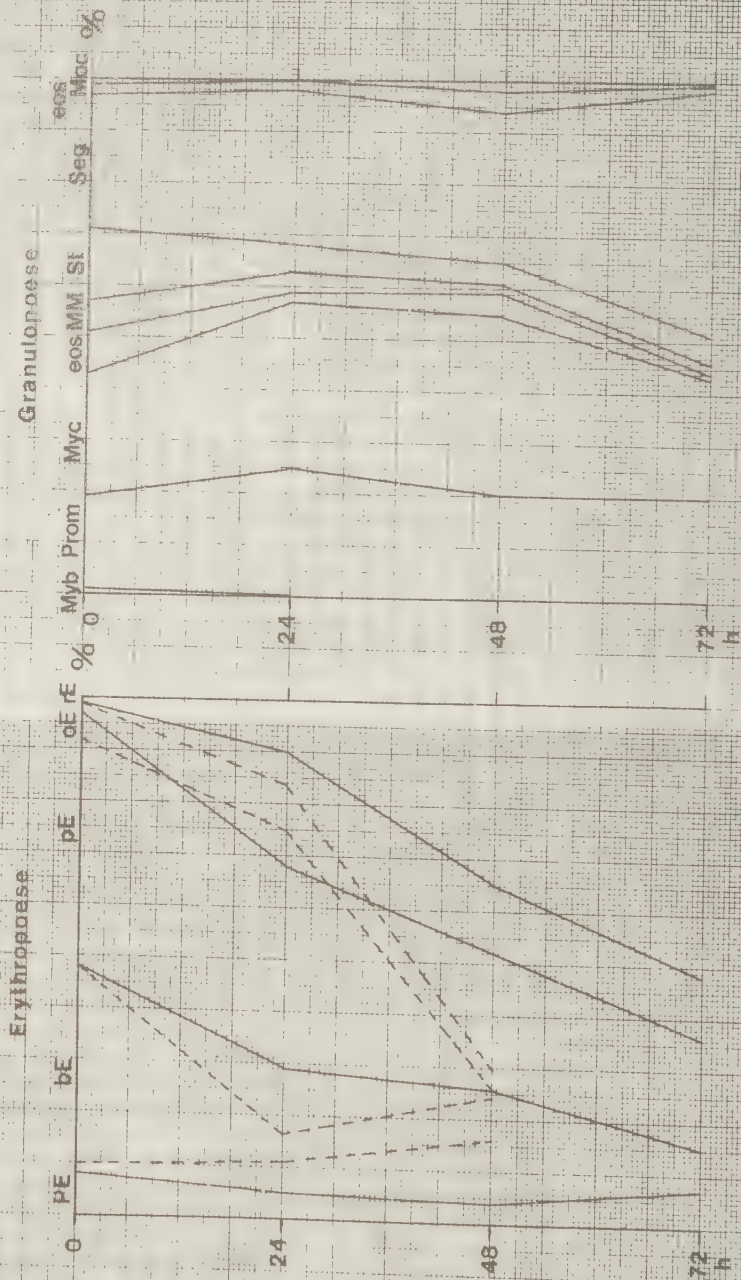


Abb. 4: Vers. Nr. IV A, Reifungskurven von frischem (—) und 24 Stunden konserviertem (---) Knochenmark.

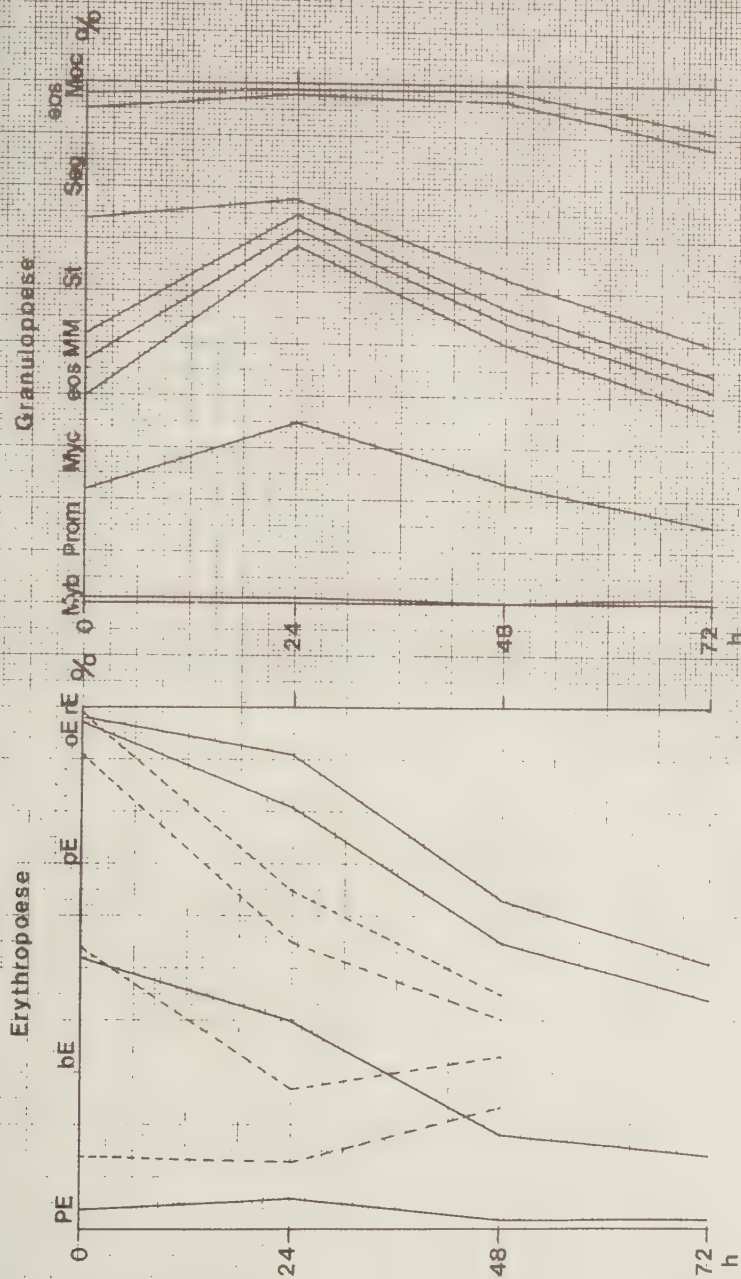


Abb.5: Vers.Nr.IV B, Reifungskurven von frischem (—) und 24 Stunden konserviertem (---) Knochenmark.

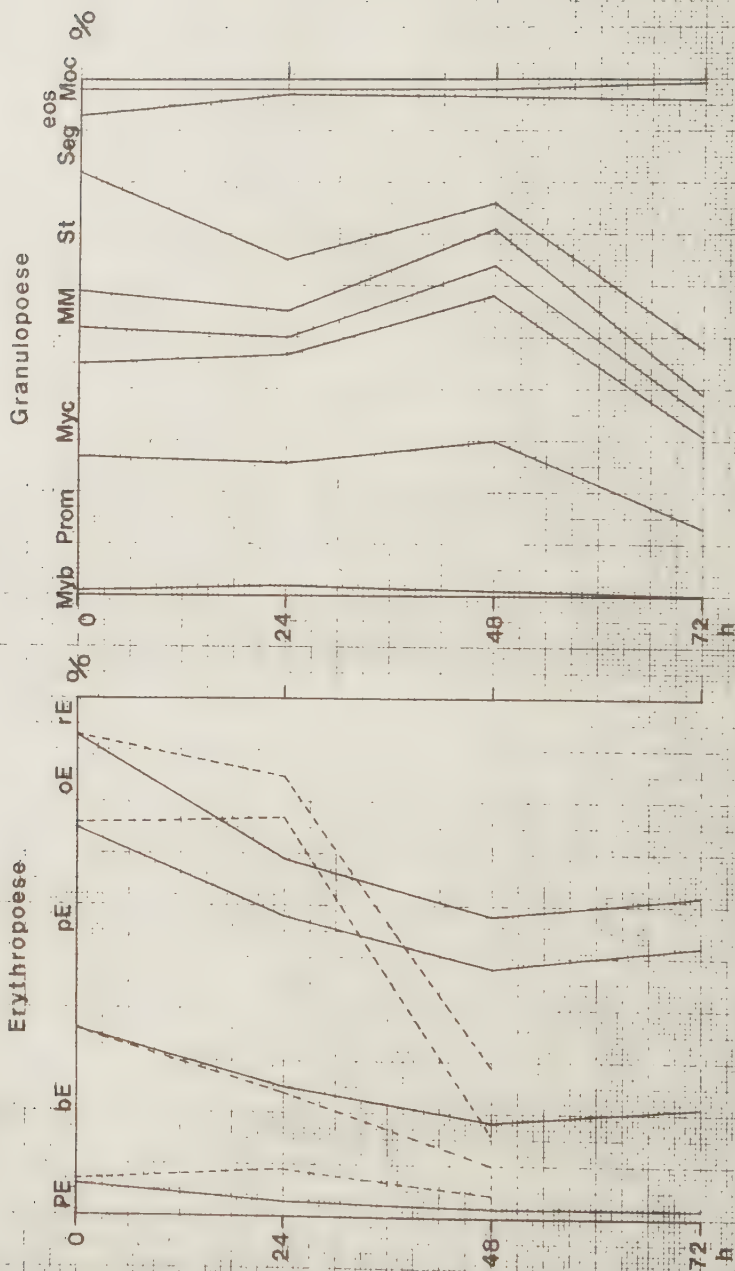


Abb. 6: Vers.Nr. VI, Reifungskurven von frischem (—) und 3 Tage konditioniertem (---) Medium.

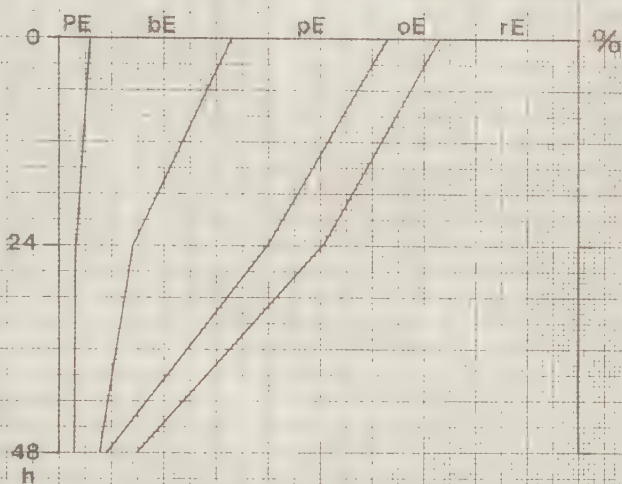


Abb.7: Vers.Nr.I, Reifungskurven der Erythropoese nach 24 Stunden Konservierung.

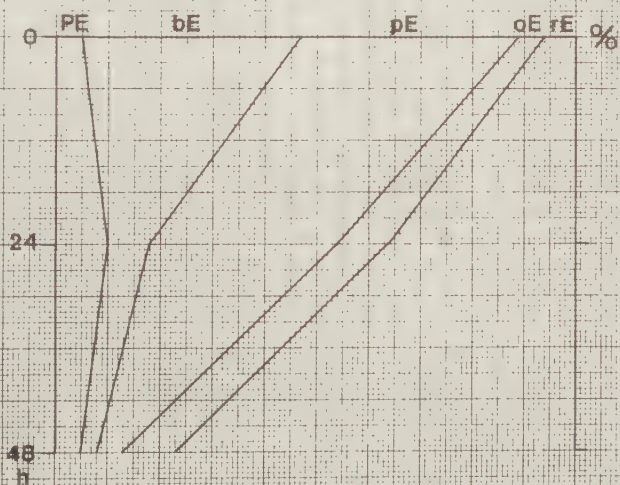


Abb.8: Vers.Nr.II, Reifungskurven der Erythropoese nach 24 Stunden Konservierung.

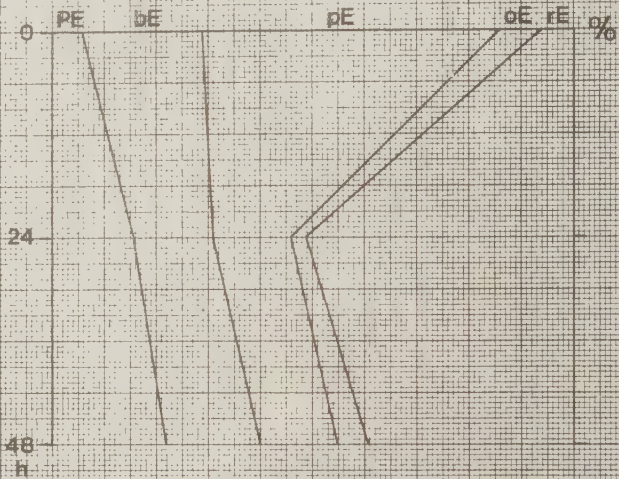


Abb.9: Vers.Nr.V, Reifungskurven der Erythropoese nach 24 Stunden Konservierung.

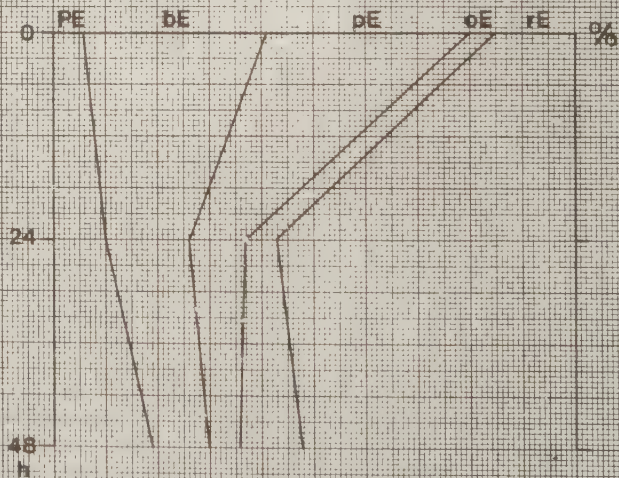


Abb.10: Vers.Nr.VII, Reifungskurven der Erythropoese nach 7 Tagen Konservierung.

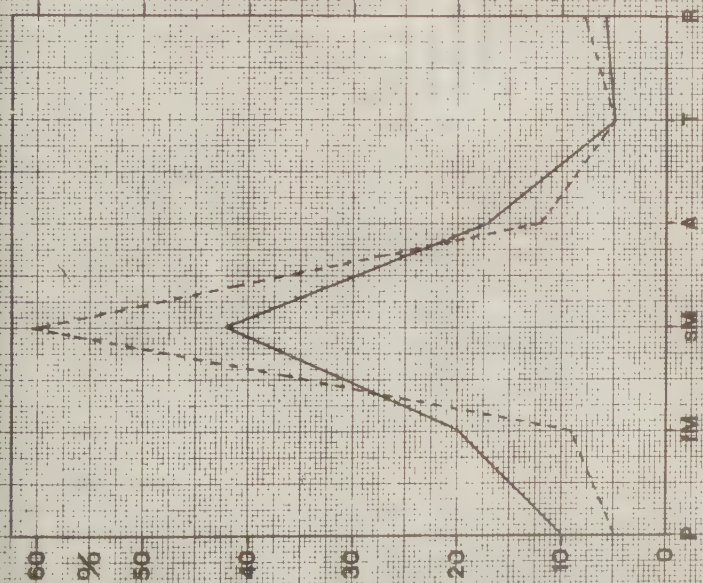


Abb. 11: Karyologische Kurven aller Erythroblastenmitosen in den Zellauspensionen vor dem Einfrieren (—, = 66 Mitosen) und nach dem Auftauen (---, = 57 Mit.)

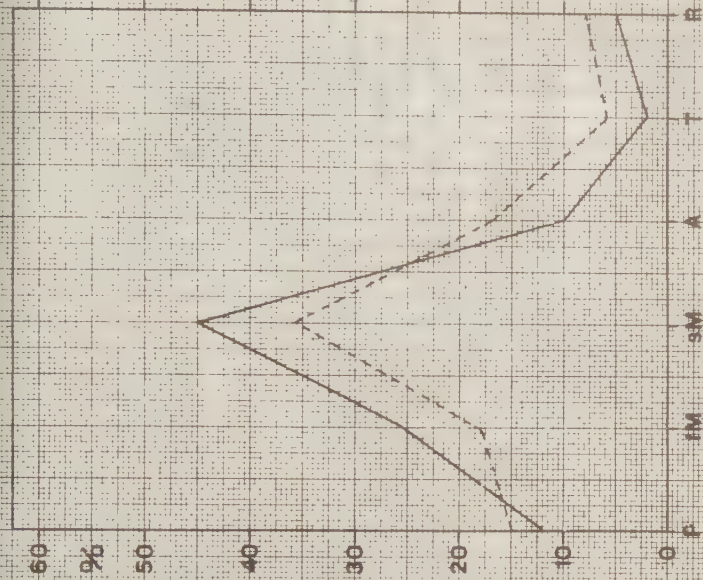


Abb. 12: Karyologische Kurven aller Erythroblastenmitosen in Kulturen von frischen (—, = 65 Mitosen) und konservierten Zellen (---, = 177 Mit.)

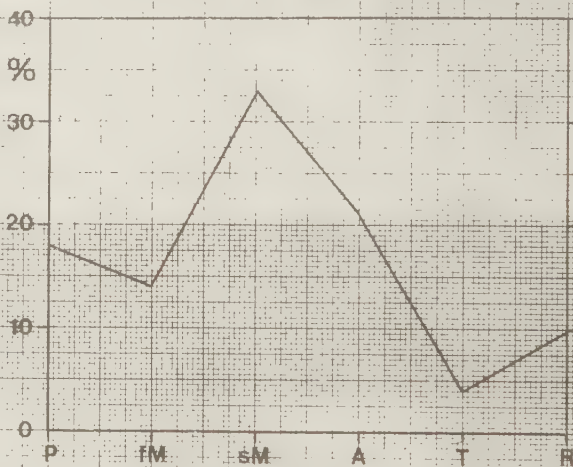


Abb.13: Karyologische Kurve aller Mitosen
(= 56) von konservierten Proery-
throblasten in vitro.

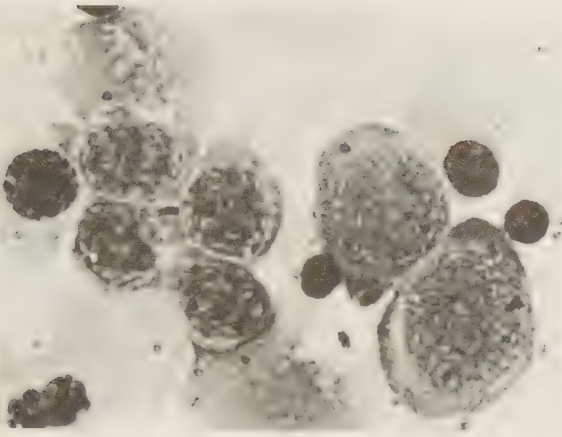


Abb.14: Vers.Nr.VI, 24h-Kultur von 3 Tage
konserviertem Knochenmark.
Erythroblasten aller Reifestufen.

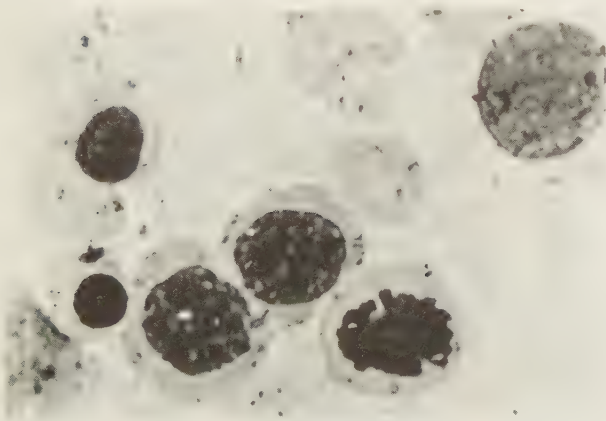


Abb.15: Vers.Nr.VI, 24h-Kultur von 3 Tage
konserviertem Knochenmark.
Myeloblast, polychrom.Erythroblast
in später Metaphase, Erythroblasten.

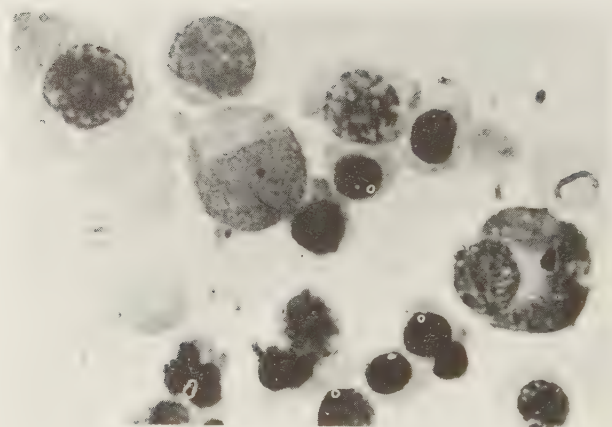


Abb.16: Vers.Nr.VI, 24h-Kultur von 3 Tage konserviertem Knochenmark.
Promyelozyt, Plasmazelle und viele Erythroblasten.

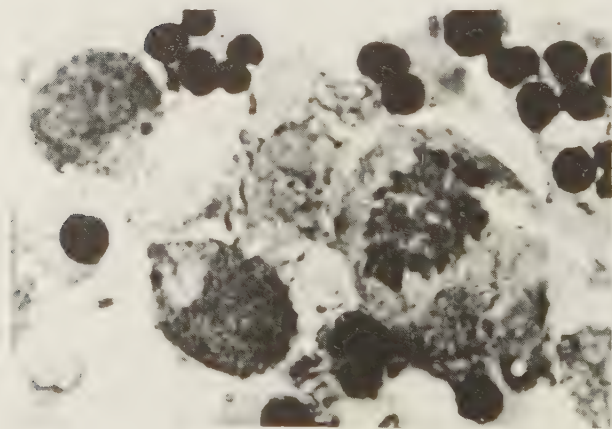


Abb.17: Vers.Nr.VI, 48h-Kultur von 3 Tage konserviertem Knochenmark.
3 Proerythroblasten, einer davon in Anaphase, und reife Erythrobl.

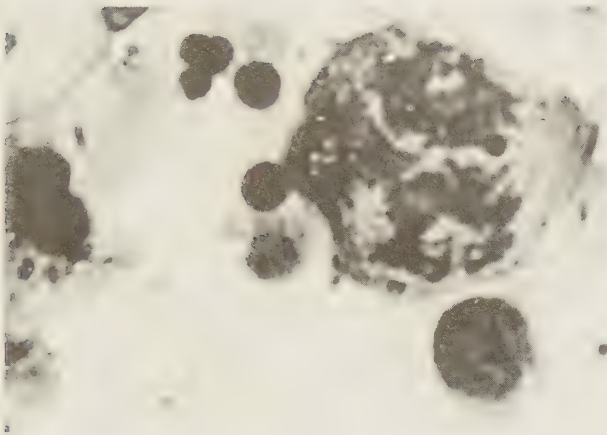


Abb.18: Vers.Nr.VI, 48h-Kultur von 3 Tage konserviertem Knochenmark.

Proerythroblast in mehrpoliger Mitose, Lymphozyt, reife Erythroblastenkerne.

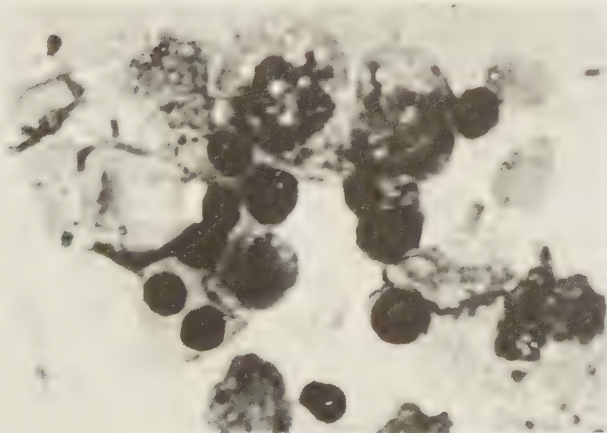


Abb.19: Vers.Nr.VI, 48h-Kultur von 3 Tage konserviertem Knochenmark.

Rekonstruktionsphase einer großen basophilen Zelle, reife Erythroblasten.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. ASHWOOD-SMITH, M. J.
Preservation of mouse bone marrow at -79°C
with DMSO.
Nature 190:1204 (1961)
2. ASHWOOD-SMITH, M. J.
Low temperature preservation of mouse lympho-
cytes with DMSO.
Blood 23:494 (1964)
3. ASHWOOD-SMITH, M. J.
The preservation of bone marrow.
Cryobiology 1:61 (1964)
4. BARNES, D. W. H. and J. F. LOUTIT
Protective effects of implants of splenic
tissue.
Proc. Roy. Soc. Med. 46:251 (1953)
5. BARNES, D. W. H. and J. F. LOUTIT
The radiation recovery factor: Preservation
by the Polge-Smith-Parkes technique.
N. Nat. Canc. Inst. 15:901 (1955)
6. BELANGER, L. F.
A method for the estimation of in vitro survival
of human marrow cells, utilizing radioautographic
detection of H^3 -thymidine uptake.
Canad. med. Ass. J. 85:868 (1961)
7. BENDER, M. A., The Tran, L. H. SMITH
Preservation of viable bone marrow cells by
freezing.
J. appl. Physiol. 15:520 (1960)

8. BERMAN, L., C.S. STULBERG, and F.H. RUDDLE
Long-term tissue culture of human bone marrow.
1) Report of isolation of a strain of cells
resembling epithelial cells from bone marrow
of a patient with carcinoma of the lung.
Blood 10:896 (1955)
9. BERMAN, L.
Review of methods studying maturation of human
erythroblasts in vitro: Evaluation of a new
method of culture of cell suspension in a
clot-free medium.
Blood 14:1194 (1959)
10. BICKIS, I. J., K. KAZAKS, J. J. FINN, I. W. D. HENDERSON
Permeation kinetics of glycerol and DMSO in
Novikoff hepatoma ascites cells.
Cryobiology 4:1 (1967)
11. BICKIS, I. J.
Effect of freezing on the metabolism of Novikoff
hepatoma ascites cells.
Cryobiology 2:27, Abstr. 57 (1965)
12. BILLEN, D.
Recovery of lethally irradiated mice by treatment
with bone marrow cells maintained in vitro.
Nature 179:574 (1957)
13. BILLEN, D.
Effect of bone marrow culture in vitro on its
protective action in irradiated mice.
J. Nat. Canc. Inst. 23:1389 (1959)
14. BLOCK, L. H.
DMSO - Medicinal and pharmaceutical aspects.
Drug a. Cosmetic Ind. 95:342 (1964)
15. BOLL, I., G. FUCHS
Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Konser-
vierung von menschlichem Knochenmark in vitro.
Blut 7:257 (1961)

16. BOLL, I.
Granulozytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966)
17. BOLL, I., G. MERSCH
Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro.
Blut 17:193 (1968)
18. BOLL, I., G. MERSCH
Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulozytopoese in vitro.
Blut 19:257 (1969)
19. BOLL, I., G. FUCHS
A kinetic model of granulocytopoiesis.
Exp. Cell Res. 61:147 (1970)
20. BORNHÖFT, J.
Die Einwirkung von Dimethylsulfoxyd auf menschliches Knochenmark in vitro.
Diss. Berlin 1971
21. BORTIN, M. M.
A compendium of reported human bone marrow transplants.
Transplantation 9:571 (1970)
22. BOURONCLE, B. A.
Preservation of human normal and leukemic cells with DMSO at -80°C .
Cryobiology 3:445 (1967)
23. BOURONCLE, B. A., J. F. ASCHENBRAND, and R. F. TODD
Comparative study of the effectiveness of DMSO and PVP in the preservation of human leukemic blood cells.
Cryobiology 6:409 (1970)

24. BRUCH, C. and H.-D. FLAD
Freezing of non-proliferating and proliferating human blood lymphocytes. In vitro studies on their viability in culture.
XIII. Intern. Cong. Hemat. München 1970
25. BRÜSTER, H.
Indikationen und Durchführung von Knochenmarkstransplantationen.
Kinderärztl. Praxis 36:21 (1968)
26. BUCKNER, C. D.
Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiated in a patient with leukemia.
Blood 35:741 (1970)
27. BURKI, H. J., S. O. KADA
Freezing, storage and thawing of mouse leukemic cells, L 5178 Y, in culture. (32804).
Proc. Soc. exp. Biol. 127:794 (1968)
28. CAVINS, J. A., S. KASAKURA, E. D. THOMAS, and J. W. FERREBEE
Recovery of lethally irradiated dogs following infusion of autologous marrow stored at low temperature in DMSO.
Blood 20:730 (1962)
29. CAVINS, J. A., I. DJERASSI, A. J. ROY, and E. KLEIN
Preservation of viable human granulocytes at low temperatures in DMSO.
Cryobiology 2:129 (1965)
30. CORNECI, I., T. ANDRIAN, N. VOICULETZ, and E. BUZI
Decreasing viability and restoring capacity of autogenic bone marrow cells after 1- to 10-day periods of storage at +4°C: Dye-exclusion and ³H-TdR tests.
Exp. Haemat. 15:120 (1968)
31. DAVIES, I. D., A. S. COULSON, and A. F. SMITH
Clarification on the effects of the heat of solution of DMSO and the latent heat of fusion of ice on lymphocytes using an in vitro test for viability.
Cryobiology 2:263 (1966)

32. DOEBBLER, G.F., P.C.SCHAFFER, and G.J.SAFFORD
Neutron inelastic scattering studies of aqueous
solutions of dimethyl sulfoxide and dimethylsulfone.
Cryobiology 6:261 Abstr.14 (1969)
33. DOUGHERTY, R.M.
Use of DMSO for preservation of tissue culture
cells by freezing.
Nature 193:550 (1962)
34. EHRLICH, K.
Vergleichende Untersuchungen zur Proliferations-
kinetik des Knochenmarks in Koagulum- und Suspen-
sionskulturen.
Med.Diss.Berlin (1970)
35. ERSLEV, A.I. and J.R.HUGHES
The influence of environment on iron incorporation
and mitotic division in a suspension of normal
bone marrow.
Brit.J.Haemat. 6:414 (1960)
36. FARNES, P. and B.E.BARKER
Tissue culture studies of human bone marrow.
I) Maturation of granulocytes in chemically
defined medium.
J.Nat.Canc.Inst. 39:1045 (1967)
37. FARRANT, J.
Mechanism of cell damage during freezing and
thawing and its prevention.
Nature 205:1284 (1965)
38. FERREBEE, J.W., D.BILLEN, T.H.URSO, L.WAN CHING,
E.D.THOMAS, and C.C.CONGDON
Preservation of radiation recovery factor in
frozen marrow.
Blood 12:1096 (1957)

39. FLIEDNER, T.M., E.D. THOMAS, L.M. MEYER, and E.P. CRONKITE
The fate of transfused H^3 -thymidine-labeled bone marrow cells in irradiated recipients.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 114:510 (1964)
40. FLIEDNER, T.M.
Pattern of regeneration of nitrogen mustard treated marrow after transfusion into lethally irradiated homologous recipients.
Colloque du Centre National de la Recherche Scientifique sur la greffe des cellules hématopoïétiques allogéniques, 1964
41. FRIEDMAN, B.I.
The effects of filtration on stored human bone marrow.
Bone Marrow Conference, Paris 1967, p.1398
42. FUCHS, G.
Theorie und Praxis stochastischer Modelle für die Entwicklung von in vitro isolierten Knochenmarkpopulationen.
Method. Inform. Med. 5:86 (1966)
43. FURUSHO, K. and N. NOZOE
Bone marrow transplantation to a leukemic child with preparative treatment of large-dose of prednisolone, gold-sol and 6-mercaptopurine.
Ann. paediat. (Japan) 13:57 (1968)
44. Geigy Documenta
Wissenschaftliche Tabellen
J.R. Geigy, Basel (1969)
45. GREAVES, R.J.N., J. NAGINGTON et al.
Preservation of living cells by freezing and by drying.
Fed. Proc. 22:91 (1963)
46. GREAVES, R.I.N. and J.D. DAVIES
Separate effects of freezing, thawing and drying living cells.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 125:548 (1965)

47. GREIFF,D. and S.MACKEY
Cryobiology of platelets.
II) Effects of freezing and storage at low temperature on the survival of isolated human blood platelets as measured by assays for aminopeptidase.
Cryobiology 7:9 (1970)
48. GROSS,W.O.
Die Optimalbedingungen zur Gefrierkonservierung mit Dimethylsulfoxid.
Z.Naturforsch. 23:512 (1968)
49. HATHAWAY,W.E., L.A.NEWBY, and J.H.GITHENS
The acridine orange viability test applied to bone marrow cells.
I) Correlation with trypan blue and eosin dye exclusion and tissue culture transformation.
Blood 23:517 (1964)
50. HAUSCHKA, T.S., J.T.MITCHELL, and D.J.NIEDERPRUEM
A reliable frozen tissue bank: Viability and stability of 82 neoplastic and normal cell types after prolonged storage at -78°C .
Cancer Res. 19:643 (1959)
51. HENDERSON,I.W.D.
The kinetics of glycerol and DMSO movement in and out of cells during preincubation and washing.
Cryobiology 2:27, Abstr.56 (1965)
52. HENNING,N. und S.WITTE
Über die Möglichkeiten einer autologen Knochenmarkszelltransfusion.
Med.Klin. 16:668 (1963)
- HEVESY,G.V.
Anwendung von Isotopen-Indikatoren in der Haematologie.
5.Europ.Haematol.Kongr.Heidelberg (1955)

54. HOPPE, I.
Zur Anwendung von DMSO bei der Konservierung von
Erythrozyten und teilungsfähigen Zellen.
Bibl.haemat.(Basel) 32:217 (1969)
55. HØST, H.
The effect of colcemid on bone marrow cells studied
by a quantitative method.
Acta path.microbiol.scand. 67:27 (1966)
56. JACOB, S.W., M.BISCHEL and R.J.HERRSCHLER
DMSO: A new concept in pharmacotherapy.
Curr.Therap.Res. 6:134 (1964)
57. JANKAY, L.
Comparative study of preserving human bone marrow
by cultivation versus conventional freezing process.
Blood 21:775 (1963)
58. JOHN, H.
Erfahrungen mit der therapeutischen Anwendung
von Dimethylsulfoxyd in der Orthopädie.
Med.Diss.Berlin (1965)
59. KAROW, A.M. and W.R.WEBB
Tissue freezing. A theory for injury and survival.
Cryobiology 2:99 (1965)
60. KLEINSORGE, H. und W.MAY
Die Behandlung des akuten Knochenmarksyndroms mit
isologen gefriergetrockneten Knochenmarkzellen.
Dtsch.Gesundh.Wes. 26:1109 (1963)
61. KOLB, K.H., G.JÄNICKE u.a.
Das Verhalten von ³⁵S markierten Dimethylsulfoxyd
im menschlichen und tierischen Organismus.
Arzneimittelforschung 15:1292 (1965)
62. KOWALENKO, P.P.
Die Lebensfähigkeit der Gewebe bei tiefen Einfrier-
temperaturen.
2.Sympcs.über Gewebekonserv.Ost-Berlin (1963)

63. KRANTZ, S.B., O. GALLIEN-LARTIQUE and E. GOLDWASSER
The effect of erythropoietin upon heme synthesis
by marrow cells in vitro.
J. Biol. Chem. 238:4085 (1963)
64. KURNICK, N.B., B.H. FEDER, A. MONTANO, I.C. GERDES,
and R. NAKAMURA
Some observations on the treatment of postirradiation
hematopoietic depression in man by the infusion of
stored autogenous bone marrow.
Ann. intern. Med. 51:1204 (1959)
65. LAJTHA, L.G.
Culture of human bone marrow in vitro. The rever-
sibility between normoplastic and megaloblastic
series of cells.
J. clin. Path. 5:67 (1952)
66. LAJTHA, L.G.
Bone marrow in culture.
In "Cells and tissues in culture", Vol. II,
ed. E.N. Willmer, Academic Press Inc. London,
1965 pp 178-196
67. LALA, P.K., M.A. MALONEY, and H.M. PATT
A comparison of two markers of cell proliferation
in bone marrow.
Acta haemat. 31:1 (1964)
68. LEIBO, S.R., I. FARFANT, P. MAZUR, M.G. HANNA, and
L.H. SMITH
Effects of freezing on marrow stem cells suspensions:
Interactions of cooling and warming rates in the
presence of PVP, sucrose and glycerol.
Cryobiology 6:315 (1970)
69. LEWIS, J.P., M.P. FARNES, F.E. TROBAUGH et al.
The transplantation potential of fresh and stored
hematopoietic tissue as estimated by standard
in vitro-technique.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 114:701 (1964)

70. LEWIS, J. P., M. PASSOVOY, S. A. CONTI, P. A. FATE,
F. E. TROBAUGH
The effect of cooling regimens on the transplan-
tation potential of marrow.
Transfusion 7:17 (1967)
71. LINDSLEY, D. L., T. T. ODELL jr., and F. G. TAUSCHE
Implantation of functional erythropoietic elements
following total-body irradiation.
Proc. Soc. exp. Biol., N. Y. 90:512 (1955)
72. LOCHTE, H. L. jr., J. W. FERREBEE, and E. D. THOMAS
In vitro studies on the preservation of marrow
cells in glycerol at low temperatures.
J. Lab. clin. Med. 53:117 (1959)
73. LORENZ, E., D. UPHOFF, T. R. REID, and E. J. SHELTON
Modification of irradiation injury in mice and
Guinea pigs by bone marrow injections.
J. Nat. Canc. Inst. 12:197 (1951)
74. LOVELOCK, I. E.
Haemolysis of human red blood cells by freezing
and thawing.
Biochim. biophys. Acta 10:414 (1953)
75. LOVELOCK, I. E.
The mechanism of the protective action of glycerol
against haemolysis by freezing and thawing.
Biochim. biophys. Acta 11:28 (1953)
76. LOVELOCK, I. E. and BISHOP, M. W. H.
Prevention of freezing damage to living cells by
dimethyl sulphoxide.
Nature 183:1394 (1959)
77. LUYET, B.
Effects of ultra rapid and of slow freezing and
thawing on mammalian erythrocytes.
Biodynamica 6:217 (1949)

78. LUYET,B., G.RAPATZ
A review of basic researches on the cryopreservation of the red blood cells.
Cryobiology 6:425 (1970)
79. LUYET,B., R.KEENER
Observations on the high vulnerability of leukocytes to cryoinjury.
Cryobiology 6:578, Abstr.25 (1970)
80. MAKIN,G.S. and J.M.HOWARD
DMSO and supercooling for storage of canine kidneys.
Arch.Surg. 91:564 (1965)
81. MAKINODAN,T.
Circulating rat cells in lethally irradiated mice protected with rat bone marrow.
Proc.Soc.exp.Biol. 92:174 (1956)
82. MALININ,T.J., V.P.PERRY
A review of tissue and organ viability assay.
Cryobiology 4:104 (1967)
83. MALININ,T.J., P.P.VERNON
Toxicity of dimethyl sulphoxide on HeLa cells.
Cryobiology 4:90 (1967)
84. MALININ,T.J.
Freezing injury of human granulocytes.
Exp.Hemat- 18:29 (1969)
85. MALININ,T.J., D.E.PEGG, V.P.PERRY, and C.E.BRODINE
Long-term storage of bone marrow cells at liquid nitrogen and dry ice temperatures.
Cryobiology 7:65 (1970)

86. MATHE, G., H. JAMMET, B. PENDIC, L. SCHWARZENBERG, J. F. DUPLAN, B. MAUPIN, R. LATARJET, M. J. LARRIEU, D. KALIC, Z. DJURIC
Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez des humains irradiés à forte doses accidentellement.
Rev. franç. Et. clin. biol. 4:226 (1959)
87. MATHE, G.
Successful allogenic bone marrow transplantation in man: Chimerism, induced specific tolerance and possible anti-leukemic effects.
Blood 25:179 (1965)
88. MAZUR, P.
Physical mechanism in cell death at subzero temperatures.
Aus "Summation of presentations at Confer. Buffalo, N.Y. 18.8.1961
Blood 19:516 (1962)
89. MAZUR, P., I. FARRANT, S. P. LEIBO, and E. H. Y. CHU
Freezing and thawing of chinese hamster cells: Interactions between the optimum cooling velocity for survival and the nature and concentration of protective additive.
Exp. Hemat. 18:31 (1969)
90. MENZ, L., P. GEHENIO, B. LUYET
A cytologic study of the mechanism of injury resulting from the freezing of human leukocytes.
Cryobiology 1:18, Abstr. 41 (1964)
91. MERYMAN, H. T.
Mechanics of freezing in living cells and tissues.
Science 124:515 (1956)
92. MERYMAN, H. T.
General principles of freezing and freezing injury in cellular materials.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 85:503 (1960)

93. MERYMAN, H.T.
Preservation of living cells.
Fed. Proc. 22:81 (1963)
94. MERYMAN, H.T.
Osmotic stress as a cause of red cell freezing injury.
Exp. Hemat. 18:27 (1969)
95. MUSET, P.P. and J. MARTIN-ESTEVE
Physiological cell permeability and pharmacological action of DMSO.
Experientia 21:649 (1965)
96. NECHELES, T.F., M. STEINER, M. BALDINI
The in vitro synthesis of hemoglobin by human bone marrow in thalassemia.
Blood 25:897 (1965)
97. NEI, T.
Mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at near-zero temperatures.
II) Investigation of factors affecting hemolysis by freezing.
Cryobiology 4:303 (1968)
98. NOWELL, P.C., L.J. COLE, J.G. HABERMEYER, P.L. ROAN
Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice.
Cancer Res. 16:258 (1956)
99. OSGOOD, E.E. and A.N. MUSCOVITZ
Culture of human bone marrow.
Preliminary Report.
J. Amer. med. Ass. 106:1888 (1936)
100. OSGOOD, E.E. and I.E. BROWNLEE
Culture of human marrow. Details of a simple method.
J. Amer. med. Ass. 108:1793 (1937)

101. OSGOOD, E.E.
Culture of human bone marrow.
J. Amer. med. Ass. 109:93 (1937)
102. OSGOOD, E.E. and M.J. KRIPPAEHNE
The gradient tissue culture method.
Exp. Cell. Res. 9:116 (1955)
103. PEGG, D.E. and R.E. TROTMAN
The preservation of human bone marrow at -79°C .
A temperature-controlled method of two-stage cooling.
J. clin. Path. 12:477 (1959)
104. PEGG, D.E.
Experience in the preservation of human marrow.
Summ. Presentations Conf. Buffalo, N.Y. 18.8.1961
Blood 19:516 (1962)
105. PEGG, D.E.
Cytology of human bone marrow subjected to prolonged storage at -79°C .
J. appl. Physiol. 19:301 (1964)
106. PEGG, D.E.
Freezing of bone marrow in clinical use.
Cryobiology 1:65 (1964)
107. PEGG, D.E.
In vitro assessment of cell viability in human bone marrow preserved at -79°C .
J. appl. Physiol. 19:123 (1964)
108. PEGG, D.E.
Bone marrow transplantation.
Lloyd-Luke, Ltd., London (1966)
109. PERRY, V.P., A.M. PAPPAS, T.E. WHEELER, and C.E. BRODINE
Nutrient media storage of human bone marrow.
Cryobiology 4:204 (1968)

110. PERSIDSKY, M.D. and V. RICHARDS
Mode of protection with PVP in freezing of
bone marrow.
Nature 196:585 (1962)
111. PERSIDSKY, M.D. and V. RICHARDS
Optimal conditions and comparative effectiveness
of DMSO and PVP in preservation of bone marrow.
Nature 197:1010 (1963)
112. PERSIDSKY, M.D. and V. RICHARDS
Radiation protection of mice with bone marrow
and spleen preserved at low temperature using
PVP.
Blood 23:337 (1964)
113. PERSIDSKY, M.D. and V. RICHARDS
Cryopreservation of bone marrow with low
molecular weight PVP.
Cryobiology 2:74 (1965)
114. PERSIDSKY, M.D. and V. RICHARDS
Volume changes in bone marrow and Ehrlich
ascites cells after freezing as an index
of preservation efficiency.
Cryobiology 3:59 (1967)
115. PFISTERER, H., F. WEBER, and G. MICHLMAYR
In vivo survival of platelet concentrates
following rapid freezing and thawing.
Cryobiology 5:6 (1969)
116. PLAYFAIR, J.H.L. and D.E. PEGG
An improved container for cells preserved
by freezing.
Brit. J. clin. Path. 15:591 (1962)
117. POLGE, C., A.U. SMITH, and A.S. PARKES
Revival of spermatozoa after vitrification
and dehydration at low temperatures.
Nature 164:666 (1949)

118. PORTERFIELD, J.S. and M.J. ASHWOOD-SMITH
Preservation of cells in tissue culture by
glycerol and DMSO.
Nature 193:548 (1962)
119. POWSNER, E.R. and L. BERMAN
Effect of erythropoietin on DNA synthesis
by erythroblasts in vitro.
Blood 30:189 (1967)
120. PYLE, H.M. and H. BOYER
Preservation of human bone marrow in
dimethyl sulphoxide.
Blood 19:516 (1962)
121. PYLE, H.M. and H.F. BOYER
Factors influencing the poststorage
viability of human bone marrow.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 114:686 (1964)
122. RAPATZ, G. and B. LUYET
Microscopic observations on the development
of the ice phase in the freezing of blood.
Biodynamica 8:197 (1960)
123. RAPATZ, G. and B. LUYET
Combined effects of freezing rates and of
various protective agents on the preserva-
tion of human erythrocytes.
Cryobiology 4:215 (1968)
124. RAPPAY, G., J. FAZEKAS and A. BALAZS
In vitro cultivation of rat bone marrow.
Haematologia 2:187 (1968)
125. RICHARDS, V. and M. PERSIDSKY
Studies in the preservation of bone marrow.
Surgery 50:288 (1961)
126. ROBERTSON, R.D., P. DESHPAUDE, L. SBEGEL, S.W. JACOB
Studies on the function of the canine heart
exposed to sub-zero temperatures.
J. Amer. med. Ass. 187:574 (1964)

127. ROSENKRANTZ, H., Z. HADIDIAN, H. SEAY, and M. M. MASON
DMSO: Its steroid solubility and endocrinologic
and pharmacologic-toxicologic characteristics.
Canc. Chemother. Rep. 31:7 (1963)
128. ROSTAND, I.
Glycerine et résistance du sperme aux bases
températures.
C. R. Acad. Sci. 222:1524 (1946)
129. ROWE, A. W., F. H. ALLEN jr.
Freezing of blood droplets in liquid nitrogen
for use in blood group studies.
Transfusion 5:379 (1965)
130. ROWE, A. W.
Biochemical aspects of cryoprotective agents
in freezing and thawing.
Cryobiology 3:12 (1966)
131. ROY, A. I. and I. DJERASSI
A bioassay in vivo from frozen human granulocytes.
Exp. Haemat. 18:25 (1969)
132. SCHMIDT-MENDE, M. und F. EISENBERGER
Möglichkeiten und Grenzen der Gefrierkonservie-
rung von Geweben und Organen.
Münch. med. Wschr. 188:1668 (1966)
133. SCHREK, R.
A method for counting the viable cells in
normal and malignant cell suspensions.
Amer. J. Canc. 28:389 (1936)
134. SCHWARTZ, I. R., E. F. REPPLINGER, C. C. CONGDON,
and L. M. TOCANTINS
Transplantation of bone marrow after preser-
vation at -70°C.
J. appl. Physiol. 11:22 (1959)

135. SHERMAN, J.K.
Freeze-thaw-induced latent injury as a
phenomen in cryobiology.
Cryobiology 3:407 (1967)
136. SHERMAN, J.K.
Freeze-thaw-induced latent injury in cells
of the renal cortex.
Cryobiology 6:98 (1969)
137. SMITH, A.U.
Prevention of haemolysis during freezing
and thawing of red blood cells.
Lancet 2:910 (1950)
138. SMITH, L.H. and T.W. McKINLEY jr.
Erythropoietic capacity of short-term mouse
marrow cultures.
J. Nat. Canc. Inst. 35:573 (1965)
139. SMITH, L.H.
Long-term preservation of bone marrow.
Nature 205:503 (1965)
140. STORB, R., R.B. EPSTEIN, and E.D. THOMAS
Transplantation of allogenic canine bone
marrow stored at -80°C in DMSO.
Exp. Haemat. 18:30 (1969)
141. SWAN, H.T., E.H. REISNER jr., and M. SILVERMAN
The effect of various metabolites on the growth
of marrow cells in vitro.
Blood 10:735 (1955)
142. THOMAS, E.D. and LOCHTE H.L. jr.
DNS-Synthesis by bone marrow cells in vitro.
Blood 12:1086 (1957)
143. TILL, J.E. and E.A. McCULLOCH
A direct measurement of radiation sensitivity
of normal mouse bone marrow cells.
Radiat. Res. 14:213 (1961)

144. WITTE, S.
Die Knochenmarktransfusion.
J. Lehmanns Verlag, München (1963)
145. WITTE, S., G. BARTH, H. GRAEBNER und N. HENNING
Zur Wirkung von frischem und tiefgefroren
konserviertem isologen Knochenmark auf das
haematologische Strahlensyndrom nach letaler
Ganzkörperbestrahlung der Ratte.
Strahlentherapie 122:48 (1963)
146. WODINSKY, I., K. MEANY, C. J. KENSLER
Viability of forty-two neoplasms after long-
term storage in liquid nitrogen at -195°C .
Cryobiology 6: 587 Abstr. 49 (1970)

Diese Arbeit entstand auf Anregung und mit Unterstützung von Frau Prof.Dr.I. B o l l. Für ihre Einführung in die hämatologischen Arbeitsmethoden und für ihre Hilfe bei allen aufgetretenen Schwierigkeiten möchte ich an dieser Stelle besonders danken.

Herrn Prof.Dr.Dr.G. F u c h s - Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation im Klinikum Steglitz - danke ich für die Beratung bei den statistischen Erhebungen.

Lebenslauf

- 26.9.1942 in Wilhelmshaven geboren als zweiter Sohn des Meteorologen Wolfgang Collmann und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Riemann.
- 1949-1962 Besuch der Grundschule und des Wilhelm-Gymnasiums in Hamburg.
- 31.1.1962 Abitur am Wilhelm-Gymnasium.
- 1962-1967 Studium der Medizin an den Universitäten Saarbrücken und Berlin.
- 28.11.1968 Ärztliche Prüfung in Berlin.
- 1.4.1969 bis 31.10.1970 Ausbildung als Medizinal-assistent in Berlin.
- 31.10.1970 Approbation als Arzt durch den Berliner Senator für Gesundheit.
- Z.Zt. Tätigkeit als wissenschaftlicher Assistent an der Neurochirurgischen Abteilung im Klinikum Westend.

